

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

*** **

**MINISTRE DE L'ENSEGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

*** **

CENTRE UNIVERSITAIRE DE OUARGLA

DEPARTEMENT DU GENIE DES PROCEDES CHIMIQUES

PROJET DE FIN D'ETUDES POUR L'OBTENTION
DU DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT
SPECIALITE : CHIMIE INDUSTRIELLE
OPTION : GENIE CHIMIQUE

THEME

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE
L'AMPICILLINE DANS UN MILIEU BIOLOGIQUE
(URINE) PAR HPLC

PROMOTEUR :

MR. L. SEKHRI

SUIVI PAR :

MR. K. BOUARIOUA

ELABORE PAR:

Melle GAGUI Mounira

ORGANISME D'ACCUEIL

CRD SAIDAL

PROMOTION 99 / 2000

SOMMAIRE

	page
<u>Introduction</u>	
<u>PARTIE THEORIQUE</u>	
<u>Chapitre I : Généralité sur les médicaments</u>	
I . 1 / - Définition.....	1
I . 2 / - Classification des médicaments	2
I . 3 / - Les antibiotiques.....	3
1 / - Définition.....	3
2 / - Classification des antibiotiques	4
<u>Chapitre II : Généralité sur l'ampicilline</u>	
II . 1 / - Définition.....	5
II . 2 / - Caractéristiques	5
1 / - Dénomination et formule chimique.....	5
2 / - Caractère	7
3 / - Présentation pharmaceutique.....	7
4 / - Effets thérapeutiques.....	7
5 / - Effets Indésirables.....	8
6 / - Interactions Médicamenteuses.. ..	8
7 / - Pharmacodynamie.....	8
8 / - Pharmacocinétique.....	9
<u>Chapitre III : L'urine</u>	
III . 1 / - Définition.....	
III . 2 / - Caractères généraux à l'état normal	
III . 3 / - Eléments normaux de l'urine.....	
<u>Chapitre IV : Notion sur la chromatographie</u>	
IV . 1 / - Historique	13
IV . 2 / - Définition.....	14
IV . 3 / - Classification des méthodes chromatographiques.....	14
<u>Chapitre V : Chromatographie liquide à haute performance</u>	
V . 1 / - Définition.....	18
V . 2 / - Principe.....	19
V . 3 / - Appareillage.....	20
V . 4 / - Analyse qualitative.....	23
V . 5 / - Analyse quantitative.....	25
V . 6 / - Travaux Antérieurs.....	26
<u>Chapitre VI : Les méthodes d'analyses utilisées</u>	
VI . 1 / - Chromatographie sur couche mince.....	27
VI . 2 / - Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	27
VI . 3 / - Spectroscopie Infra - Rouge (IR).....	28
VI . 4 / - Spectroscopie - UV	28

Chapitre VII : Validation d'une Méthode d'analyse

VII . 1 / Définition.....	29
VII . 2 / Critère de la validation.....	29

PARTIE EXPERIMENTALE

I /- <u>But</u>	33
II /- <u>Contrôle de qualité de la matière première</u>	
- Caractéristiques générales.....	33
- Matériels et réactifs.....	35
III /- <u>Mise au point de la méthode de dosage</u>	
III . 1 / - Contrôle de performance de la colonne C ₁₈	39
III . 2 / - Choix des conditions opératoires.....	39
III . 3 / - Optimisation des conditions chromatographiques.....	40
III . 4 / - Validation de la méthode.....	41
1 / - Spécificité.....	41
2 / - Sélectivité.....	41
3 / - Linéarité.....	42
4 / - Précision.....	43
5 / - Limité de détection.....	44
6 / - Intervalle de dosage.....	45
IV - <u>Application sur l'échantillon final</u>	
IV.1/-Calcul.....	46
IV.2/-Interprétation.....	46

Conclusion

Annexe

Bibliographie

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je remercie sincèrement tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour élaborer ce travail en particulier Messieurs :

- BOUARIOUA .K et SEKHRI .L (Promoteur et Co - promoteur)
- Dr. CHACOUJ .A (Directeur du CRD « SAIDAI . »)
- Mme HAMDI .N (Directrice du laboratoire analytique).
- L'ensemble du personnel du laboratoire analytique (CRD).

Sans oublier mes Professeurs de l'institut de Chimie Industrielle

- NASSIM et LAMIA

DEDICATION

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail a :

Deux personnes à qui je serais redevable le long de ma vie, mes très chers parents qui n'ont cessé de me soutenir durant mon cursus.

Mes frères et sœurs :

Rachid, Azzouz, Nadjet, Saloua, Houria.

Ma grande famille :

Grands-parents, Tantes et Oncles.

Tous mes ami (es)

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

Le développement d'un médicament est une épreuve de longue haleine, avant sa mise sur le marché.

En Algérie, c'est l'Entreprise nationale de production pharmaceutique «SAIDAL » (créée en 1987) par le biais du centre de recherche et développement (CRD) qui a pris cette entité en charge ; en ambitionnant toujours plus d'intégrer de nouvelles technologies afin d'atteindre l'objectif final étant d'aboutir à un médicament efficace avec une bonne sécurité d'utilisation et meilleure.

Dans le cadre du développement des médicaments génériques qui est la principale stratégie du CRD au profit du groupe «SAIDAL », il m'a été proposé d'étudier la mise au point d'une méthode de dosage de l'Ampicilline dans un milieu biologique (urine) par HPLC.

Le but de ce travail est de trouver la quantité éliminée de l'Ampicilline après son administration dans l'urine (milieu biologique).

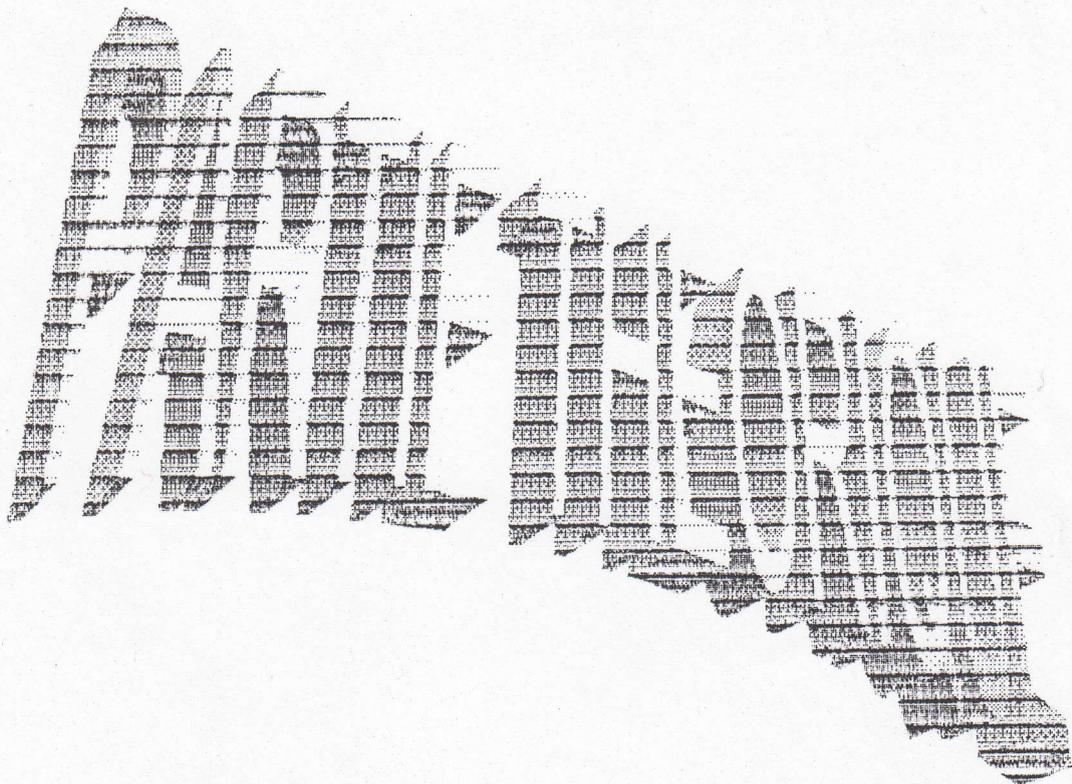
L'étude du médicament dans les milieux biologiques est devenue une source d'information indispensable dans plusieurs domaines tels que :

L'étude de la bio-équivalence entre deux formulations pharmaceutiques qui ont la même visée thérapeutique, l'étude de la biodisponibilité ...etc.

De tels dosages sont d'un grand intérêt, en bénéficiant de l'HPLC qui est devenue l'une des nouvelles techniques mises au point, les plus utilisées en particulier à polarité de phase inversée.

Cette technique a pris une place de choix grâce à sa fiabilité et son couplage aisé avec les techniques automatisées.

Au cours de ce modeste travail, la première partie sera consacrée à une étude bibliographique portant sur les médicaments en général, notre médicament et la chromatographie (précisément l'HPLC). Dans la deuxième partie (pratique), nous étudierons le comportement de l'Ampicilline par l'HPLC en sélectionnant les conditions chromatographiques optimales, on procédera ensuite à la validation par l'évaluation statistique de ces critères et l'interprétation des résultats obtenus ainsi qu'à l'application finale de la méthode et la conclusion en fin.



CHAPITRE I

Généralités

sur

les médicaments

I - Généralité sur les médicaments :

I.1 / - Définition:

<< On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques >> [1].

Cette substance peut être d'origine naturelle par emploi de produits tels qu'ils existent à l'état naturel ou à partir desquels il est possible d'extraire des médicaments ou bien souvent artificielle (obtention par synthèse) ou alors semi-artificielle car une substance naturelle inactive peut être modifiée au laboratoire et transformée en médicament .

Il est constitué d'un principe actif et de substances auxiliaires (ou excipients) .

a / - Principe Actif :

Substance , possédant par elle même ou du fait de métabolites des propriétés pharmacodynamiques (ou physiques) susceptibles d'applications thérapeutiques (ou diagnostic) et administrée en tant qu'elle sous forme de médicament [2] .

b / - Excipient :

Substance , a priori pharmacologiquement inerte , utilisée pour donner au médicament une présentation convenable à son utilisation (poids , volume , conservation etc.) [2] .

I. 2 / - Classification des médicaments :

Ceux dont on dispose aujourd'hui possèdent de nombreuses finalités ce qui permet de distinguer parmi eux quatre grandes classes [1] :

1 / - Les Médicaments utilisés à titre préventif :

Ils sont administrés , en vue de se protéger contre une maladie future (vaccins antimicrobiens) ou de modifier temporairement un processus physiologique .

2 / - Les Médicaments utilisés à titre substitutif:

Ils pallient un manque de l'organisme qui peut être :

a / - d'origine exogène (alimentaires) : vitamines .

b / - d'origine endogène : le déficit peut être définitif (insuffisance de la production d'insuline chez le diabétique) ou provisoire (déperdition hydrique par hémorragie ou diarrhée).

Dans tous ces cas , le médicament va remplacer un constituant naturel de l'organisme dont le défaut total ou partiel est responsable de la maladie .

3 / - Les Médicaments utilisés à titre symptomatique :

Il s'agit en général de substances dont l'effet ne dure qu'à la condition qu'elle demeure à concentration suffisante au niveau de l'organe cible , et dont il faut continuer l'administration aussi longtemps que la cause même de la maladie n'est pas éliminée.

Ces médicaments sont nombreux : les analgésiques , les anti-pyrétiques, les hypnotiques, les anti-inflammatoires, les modificateurs cardiaques....etc.

4/ Les Médicaments utilisés à titre curatif :

En s'attaquant à la cause même de l'état pathologique , ils permettent d'obtenir la guérison du malade .

Les substances actives entraînent soit la mort de l'agent responsable (produit bactéricides) , soit le ralentissement suffisant de sa multiplication (produits bactériostatiques) dont les antibiotiques font partie .

1. 3 / - Les Antibiotiques

1 / - Définition :

Ce mot fut employé pour la première fois , en 1942 par **WAKSMAN** qui en a donné la définition suivante :

<< Un antibiotique est une substance chimiques naturelles produites par des micro-organismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou d'autres micro-organismes >> [3,4] .

A partir de cette initiale définition ont est arrivée à une conception plus vaste , actuellement , ce terme signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité suffisamment faible vis-à-vis de l'hôte humain , animal ou végétal pour que sont administration puisse être réalisée par voie générale [4] .

C'est alors que des antibiotiques d'origine naturelle ont été ultérieurement obtenus par synthèse (chloramphénicol) et des substances artificielles

(sulfamides, quinolones ...) possèdent les mêmes propriétés .

2 / - Classification des antibiotiques :

Pour classer un antibiotique , il est fait appel à des notions essentielles qui concernent non pas tant son origine que sa nature chimique son mécanisme d'action , son spectre et ses modalités d'action . Ces critères sont donc importants à connaître car il permettent un rassemblement en familles et quelque fois en groupes dans lesquels les apparentements par leur nature chimique et leur mécanisme d'action [5] .

Selon leur effets , les antibiotiques peuvent être distingués en deux :

a / - Effet bactéricide :

Dans ce cas l'antibiotique va tuer les bactéries pour ramener leur nombre à un niveau inférieur à celui qui existait au début de la culture .

b / - Effet bactériostatique :

Il s'oppose au premier , c'est un ralentissement ou arrêt de la croissance bactérienne . Le nombre de bactéries variable après un temps d'incubation est de contact donné avec l'antibiotique est inférieur à celui observé .

Les antibiotiques sont donc doués de l'un ou l'autre effet grâce à leurs concentrations . le tableau suivant cite quelques uns :

Exemples : **Tableau 1 .**

Groupe I bactéricides	Groupe II bactériostatique
β - lactamines	Macrolides
Vancomycine	Tétracycline
Polypeptidique	Chloramphénicol
	Sulfamides

CHAPITR II

Généralités

sur

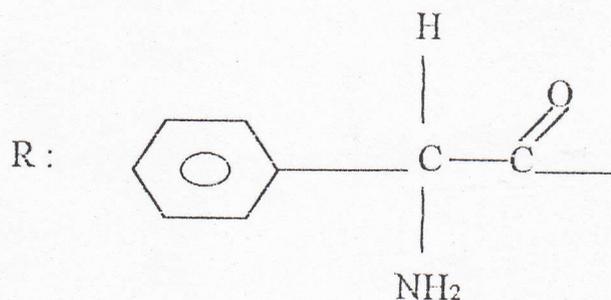
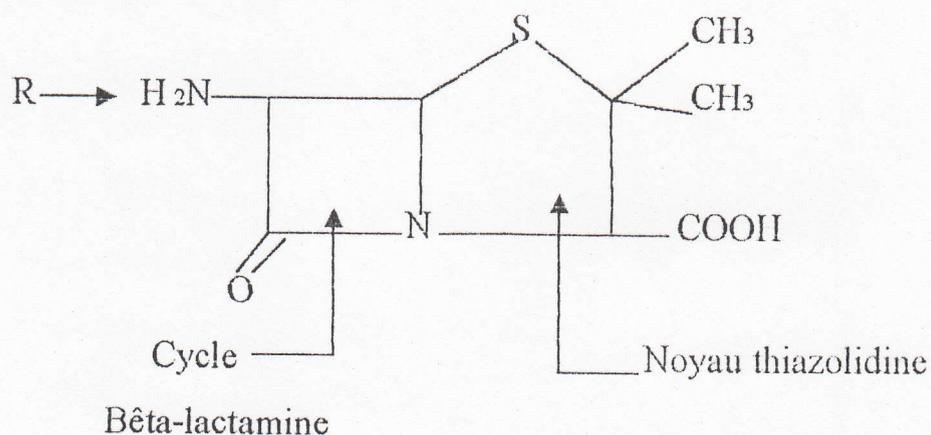
l'ampicilline

II / - Généralité sur l'ampicilline

II.1/ - Définition :

L' Ampicilline est un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, du groupe des pénicillines , du type A .

C'est le premier des antibiotiques hémisynthétique dérivés de la pénicilline née en 1965 du branchement d'un radical sur la chaîne latérale en C₆ de l'acide amino-6-pénicillanique (6-APA) dont la structure est la suivante :



Cette modification la rend stable en milieu acide tout en élargissant son activité à certains bacilles à gram (-) [5].

3/ - Présentation pharmaceutique :

En pharmacie , on utilise le trihydrate pour les formes par voie orale et le dérivé sodé pour les présentations injectables .

Gélules ou comprimés à 250, 500 et 1000 mg d'Ampicilline sous forme de trihydrate ; Poudre orale en sachets à 125 et 250 mg ; Poudre pour sirop à 500 , 250, 125mg pour 5ml [7].

4/ - Effets thérapeutiques :

- Indication :

Elles sont limitées aux infections dues aux germes définis comme sensibles notamment dans leurs manifestations :

- Respiratoire
 - ORL (otite , sinusite , angine) et stomatologiques
 - Rénales et urogénitales
 - Gynécologiques.
 - Digestives et biliaires
 - Méningées
- #### - Contre - Indication:
- Allergies aux pénicillines .
 - Infections par certains virus (risque accru d'accidents cutanés) .

5/ - Effets Indésirables :

Manifestations allergiques : gêne respiratoire . Troubles digestifs : nausées, vomissement , diarrhées.

D'autres manifestations de fortes posologies , en particulier chez l'insuffisant rénal peut entraîner des troubles de la conscience ,...

6/ - Interactions Médicamenteuses :

Association déconseillée :

Allopurinol : risque accru de phénomène cutanés .

7/ - Pharmacodynamie :

Le spectre antibactérien naturel de l'Ampicilline est le suivant:

- Espèces habituellement sensibles : Streptocoques A ; Streptocoques mitis sanguins ; streptocoques D faecalis ; pneumocoques ; gonocoques ; méningocoques leptospires; corynebactérium; diphtérie ; listeria monocylogènes clostrduim;fusobactérium; Escherichia Coli ; Proteus mirabilis; Salmonella; Shigella ; Homophilus influenzae ; Bordet Ella pertussis brucella; Vibrio cholerae ;Staphylococcus aureus (souches non productrices de pénicillinase).
- Espèces résistances (CMI \geq 16 mg /ml) Staphylocoques producteurs de pénicillinase Klebsiella ; enterobacter ; serratia ; proleus rettgeri ; providencia pseudomonas providencia; mycoplasmas ; chlamydiae ; rickettsies, acinetobacter.

8/-Pharmacocinétiques :

Le tableau suivant récapitule les propriétés pharmacocinétiques de L'ampicilline [8]

Paramètre	Bio disponibilité % (per os)	Concentration maximale (mg/L)	Clairance (mL/min)	Clairance rénale (mL/min)	Volume de distribution (L)	Fraction libre (%)	Demi-vie (h)
	33-54	7-8 (1g per os) 15-18(1g IM)	215 -300	237	14-20	80-82	1-1,7

Elimination urinaire (%) (24h)	Métabolite %	Interaction Médicamenteuse
30-40 (per os) 67-100 (IM -IV)	12-21	OUI

Tableau 2 : Propriété pharmacocinétiques de l'Ampicilline

CHAPITRE III

Lyring

III/ - L'urine (milieu biologique):

III . 1/ -Définition :

C'est l'un des liquides biologiques les plus souvent utilisés pour la détermination des substances thérapeutiques . C'est un liquide excrémental séparé du sang par les reins . La sécrétion ne se fait pas d'une façon uniforme , mais présente au cours de la journée des variations suivant l'état de santé et de maladie [9]

III.2/ - Caractères généraux à l'état normal [9] :

.Volume :

A l'état normal, en 24 heures l'urine est de 1L chez la femme , 1,25 L à 1,5 L Chez l'homme (on élimine en moyenne 20mL par 24h pour chaque Kg de poids du corps) . La quantité de nourriture et surtout de boisson fait varier ce volume .

. Densité :

En moyenne , elle varie entre 1,018 et 1,022 mais étant liée au volume des urines , elle peut diminuer ou augmenter .

. Couleur :

A l'état normal jaune (plus ou moins intense suivant la quantité de boisson et le séjour plus ou moins prolongé dans la vessie) .Elle est très claire tout de suite après les repas , par suite de l'élimination de l'eau des boissons , elle fonce quelques heures après , sous l'action de la digestion et aussi le matin .

.Acidité:

L'urine normale des 24 heures présente une réaction légèrement acide , entre pH=5 et pH=6 . Cette acidité est due à divers acides comme l'acide urique , à des phosphates acides et à une fraction importante de composé acide à l'état de sels d'ammonium .

III .3/ - Eléments normaux de l'urine :

Les uns sont de nature organique : Urée , acide urique et d'autres de nature minérale : chlorures et phosphates ...

. Urée :

C'est le principal produit final de métabolisme des protéines chez les mammifères . Sa proposition éliminée en 24 heures est de 26g (22g chez la femme) avec une alimentation mixte , mais cette quantité est considérablement influencée par le régime .

. Corp Purique:

L'adulte élimine 40g à 1g de purines , dont 30à 80cg d'acide urique par 24heures qui est lui aussi influencé par l'alimentation .

. Chlorures:

La quantité de chlorures rejetée par les urines est proportionnelle à la quantité absorbée . En 24 heures , elle est de 0,26 g (homme) à 0,17g (femme) par Kg de poids , soit 12g par jour .

.Phosphates et acide phosphorique :

La quantité d'acide phosphorique contenue dans l'urine sous forme de phosphates est de 0,037 g par Kg en 24 heures ce qui donne environ 3g chez l'homme et 2,5 g chez la femme .Le jeûne diminue ce chiffre .

.Sulfates :

Le taux élimine est de 3 g par 24 heures mais il varie avec l'alimentation .

.Acide oxalique :

L'oxalate de chaux se trouve dans l'urine à la dose de 0,02g et sa quantité varie avec l'absorption de certains légumes riches en acide oxalique .

. Chaux et magnésie :

Le taux d'élimination de la chaux 0,30g et de la magnésie 0,60g

. Azote total :

L'azote qui entre dans la constitution de plusieurs éléments de l'urine se trouve à la dose de 12 à 15g par 24 heures .

CHAPITRE IV

Notion sur la omotographie

IV/ - Notion sur la chromatographie :

IV .1/ - Historique :

Depuis sa découverte en 1903 par le botaniste russe Michael Tswett la chromatographie est passée d'une curiosité physico-chimique à une technique analytique très répandue permettant la séparation , l'identification , même le dosage de nombreuses substances chimiques [10] L'expérience de Tswett a l'époque mis en profit le phénomène d'adsorption .

En 1941 ,Martin et Synge (Prix Nobel en 1962) montrèrent que dans certains cas la phase stationnaire solide peut être avantageusement remplacée par une phase stationnaire liquide et la chromatographie de partage prend le pas sur la chromatographie d'adsorption .

Cette découverte fut suivie de la proposition d'une nouvelle méthode chromatographique sur papier par Consden Gordon et Martin en 1944 .

Il a été prévu qu'une phase mobile gazeuse peut se substituer à la phase liquide mais ce n'est qu'en 1952 que Martin et James appliquèrent cette hypothèse à la séparation des composés volatils ouvrant le champ à la chromatographie en phase gazeuse qui à son tour a connue un grand développement et donna naissance à la chromatographie en phase liquide CPL [11] et par suite la C.L.H.P dont l'efficacité et la rapidité d'analyse furent réalisées grâce à l'évaluation de l'appareillage chromatographique à nos jours .

IV .2/ - Définition :

Puisque les méthodes chromatographiques sont nombreuses et utilisent des dispositifs expérimentaux différents , il est donc difficile d'en donner une définition générale .

On peut cependant dire que dans tous les cas , il s'agit d'une méthode d'analyse utilisant la percolation d'un liquide ou d'un gaz appelé phase mobile à travers une matière poreuse ou divisée dite phase stationnaire . Au cours de ce passage , des échanges se produisent entre les différentes phases et les constituants de la phase mobile vont se séparer par suite des différences de leurs vitesses de migration [10] .

La multiplicité des procédés ainsi utilisables donnent à cette technique une grande souplesse car en plus de son rôle comme méthode de séparation de quantités notables de substances , un but analytique , qualitatif ou quantitatif grâce à la très sensibilité et spécificité que lui donne la perfection constante des moyens de détection .

IV.3/- Classification des méthodes chromatographiques :

Une variété de techniques différentes est regroupées sous le nom de méthodes chromatographiques , qui en plus de ce terme commun porte une appellation propre comme suit :

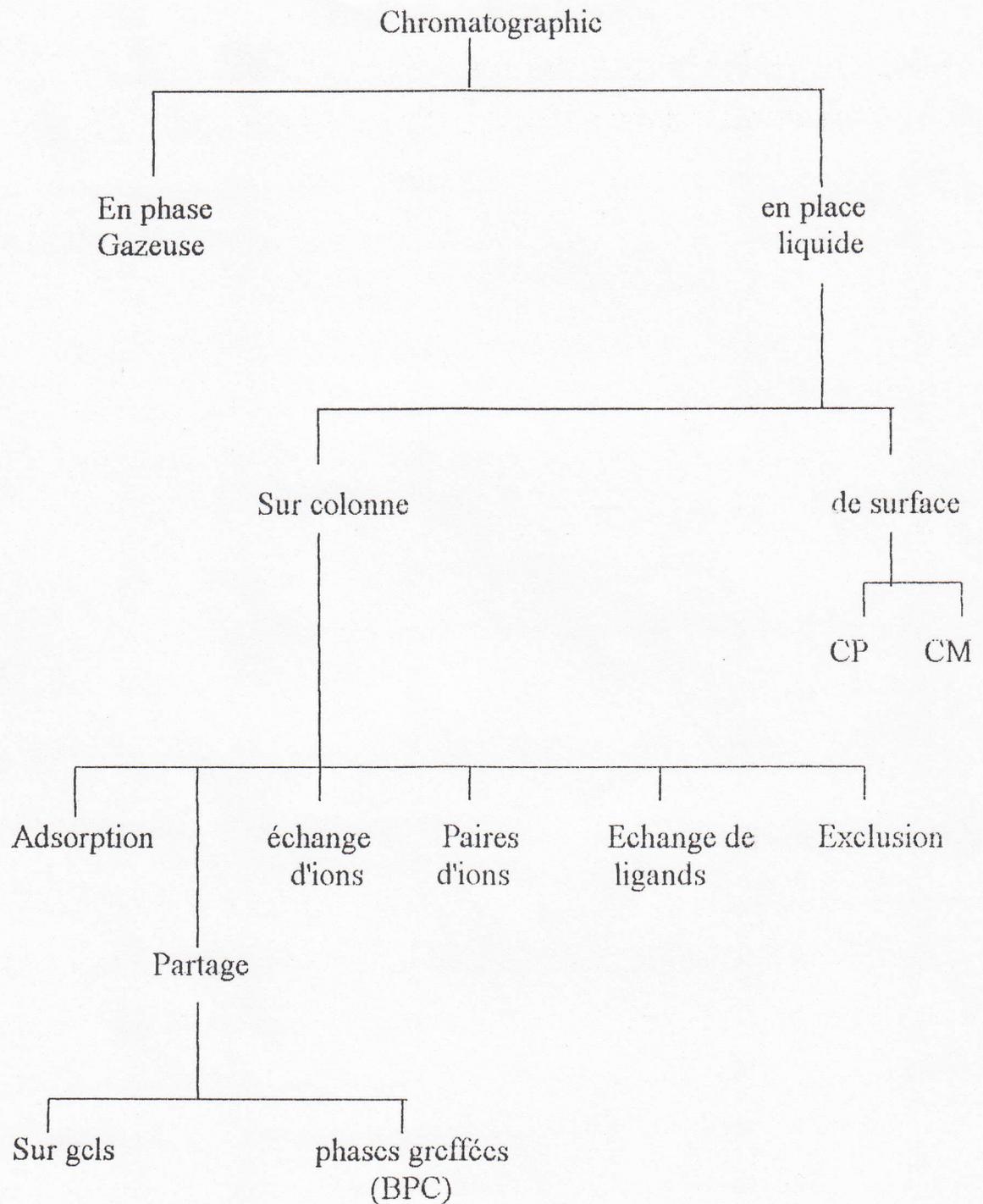


Fig.1: Classification des méthodes chromatographiques [12]

La classification se fait donc selon plusieurs aspects on distingue.

1/ - Classification selon la nature physique des phases :

La phase mobile est , par définition, un fluide , liquide ou gaz , la phase stationnaire peut être un solide finement pulvérisé ,ou un liquide immobilisé sur une phase fixe , par exemple un support poreux qui ne participe pas à la chromatographie

[11] . La combinaison de ces différentes possibilités nous mènent aux quatre types suivants :

- Chromatographie liquide - liquide
- Chromatographie liquide- solide
- Chromatographie en phase gazeuse .

2/ Classification selon le phénomène chromatographique:

- Chromatographie d'adsorption lorsque la phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes .
- Chromatographie de partage lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible à la phase mobile .
- Chromatographie par échange d'ions où la phase stationnaire est formée de macro-molécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de certains de leurs ions avec des ions de mêmes signes du mélange à Chromatographier .
- Chromatographie d'exclusion - diffusion ou plus simplement sur gel, dans laquelle la phase stationnaire est constituée par un gel qui se comporte comme un véritable tamis vis a vis des molécules ayant des poids et des structures différents .

3/ - Classification selon le procédé utilisé :

On distingue ainsi :

- Chromatographie sur colonne .
- Chromatographie de surface (Chromatographie sur couche mince (CCM) et sur papier (CP)) .

CHAPITRE V

Chromatographie

liquide à haute

performance

V/ - Chromatographie liquide a haute performance

V.1/ - Définition:

Cette nouvelle technique a remportée un grand succès lié certainement à son efficacité , sa fiabilité et sa rapidité mais également à sa capacité d'analyser des molécules non volatiles , thermosensibles , de polarité élevée [11].

Malgré , son appareillage complexe et onéreux L'HPLC est actuellement très employée tout particulièrement dans le contrôle analytique des médicaments et pour leur dosage dans les milieux biologiques . L'appareillage utilisé comprend essentiellement :

- a) - Un ou plusieurs réservoirs de phase mobile .
- b) - Un système de pompes .
- c) - Un système d'introduction des échantillons
- d) - Une colonne .
- e) - Un système de détection et d'enregistrement .

L'ensemble est représenté dans le schéma suivant :

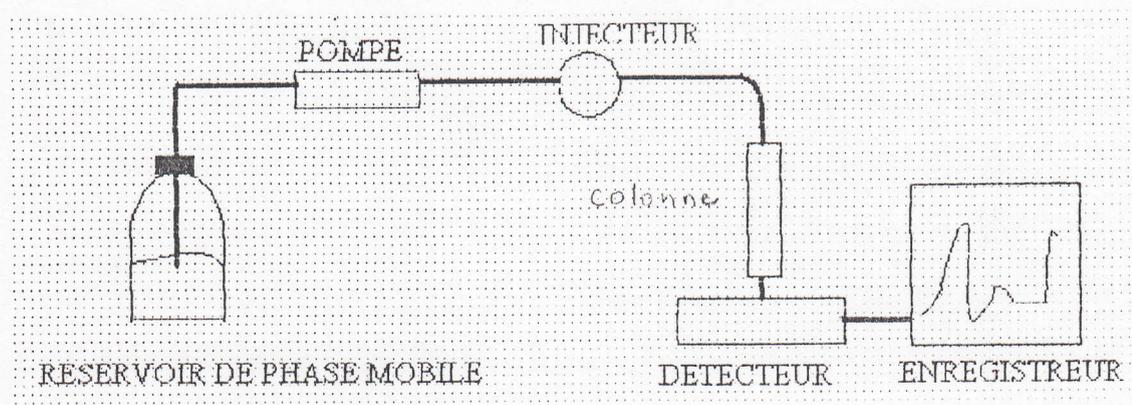


Fig. 2 : Schéma d'un chromatographe liquide haute performance C.L.H.P

V.2/ - Principe :

Une phase mobile contenue dans le réservoir est aspirée grâce à une pompe spécialement conçue pour cette chromatographie et poussée à travers un injecteur dont on introduit le soluté (de l'ordre de μl) grâce à une seringue puis à travers une colonne d'une géométrie précise .Celle dernière contient la phase stationnaire constituée d'un adsorbant solide de diamètre de particule bien défini.

A la sortie de la colonne on dispose un détecteur qui permet de révéler chaque soluté par un signal électrique amplifié puis illustré sous forme d'un pic grâce à un enregistreur , on obtient ainsi un chromatogramme .

V.3/ - Appareillage :

A/ - Réservoir de phase mobile :

La phase mobile peut être préparé et disposée dans un seul réservoir quand elle conserve pendant toute la chromatographie la même composition . Certains appareils permettent de l'obtenir par mélange de solvant provenant de réservoirs différents : La proportion de chaque liquide étant réglé par des vannes dont l'ouverture est réglable .

Il existe , aussi des systèmes munis de dispositifs de programmation qui permettent de faire varier dans les temps la composition des mélanges et d'établir des gradients de polarité .

B/ - Pompe :

Elle a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile .

Il existe deux types de pompes :

- Pompe à pression constante .
- Pompe à débit constant .

C/ - Injecteur :

Les procédés utilisés dépendent des volumes de solution à chromatographier et des pressions aux quelles s'effectuent la séparation . Les injecteurs utilisés sont :

- Les injecteurs direct : utilisés pour des très petites quantités et une pression inférieure à 150 bars .
- Les injecteurs à boucle : permettant l'injection de volumes variables allant du micro litre au millilitre et peuvent fonctionner sous de fortes pressions.

D/ - Colonne :

Les colonnes ici se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases qu'elles contiennent .

Elles sont en général courtes et droites de longueur souvent inférieure à 60 cm . Les colonnes analytiques ont des longueurs moyennes de 10 à 25 cm . Le diamètre se répartit entre 1 ;4 ;6 et 8 mm selon le mode de chromatographie utilisé .

Elles sont en acier inoxydable calibré capable de résister aux fortes pressions , plus rarement en verre .Elles peuvent être en matériaux souple (polyéthylène) et maintenues sous une compression radiale mécanique externe .

A l'intérieur d'une colonne une phase stationnaire est immobilisée, retenue par un disque poreux en acier inoxydable fritté dont la porosité est suffisamment faible pour retenir les plus fines particules .

La caractéristique essentielle des phases stationnaires est la granulométrie exprimée par le diamètre moyen des grains en micromètres . Les phases sont essentiellement constituées par de très fines particules poreuses (silice ou alumine) de forme irrégulière ou homogène .

Puisque L'HPLC exploite une grande diversité de phénomènes physiques : adsorption , partage , échange d'ions ,exclusion- diffusion de différentes phases sont envisagées . En particulier la chromatographie à polarité de phase inversée où les molécules greffées sont apolaires ou peu polaire et le plus souvent obtenue par greffage de chaînes alkyles en n-octyle : C₈ ou n- octadécyle : C₁₈ .

E /- Détecteur et enregistreur :

En HPLC , il faut pouvoir disposer de méthode et d'appareillage suffisamment sensibles et sélectifs pour déceler de très faibles quantités de produits dans une phase mobile .

Les systèmes de détection utilisés sont répartis en deux :

- à caractère universel.
- à caractère spécifique.

- La méthode réfractométrique est la plus couramment utilisée dans la première catégorie , ce type de détecteur sert à doser des substances qui n'ont pas de propriété particulières mais son utilisation reste moins répandue à cause de sa faible sensibilité tels que le détecteur IR . Tandis que pour la seconde on rencontre la spectrophotométrie UV largement utilisée .

D'autres détecteurs spécifiques à certaines substances existent en outre comme les détecteurs spectrofluorimétrique et les détecteurs électrochimiques .

Ces détecteurs sont reliés à un enregistreur ou un calculateur intégrateur permettant la caractérisation des solutés analysés les signaux électriques amplifiés se traduisent par des pics dont l'ensemble représente un chromatogramme (Fig.3).

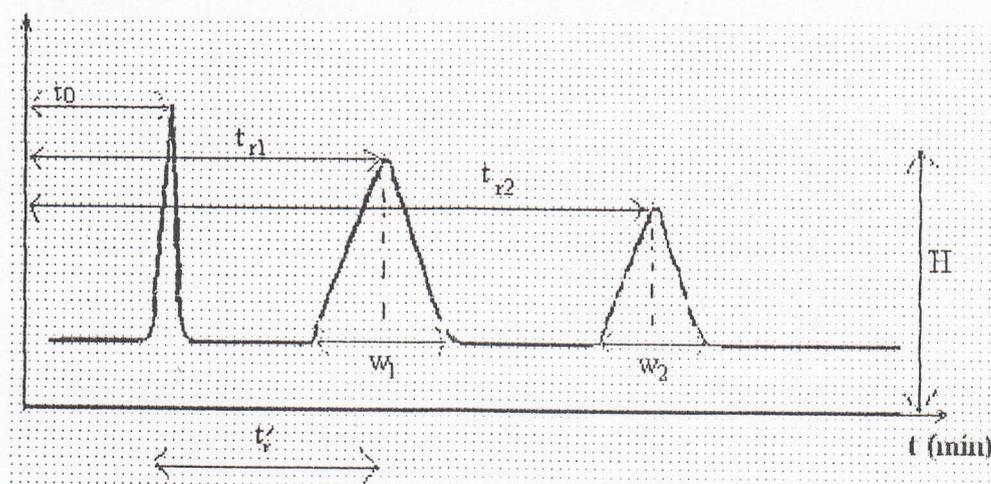


Fig. 3 : Chromatogramme

V. 4 / - Analyse qualitative :

1 / - Temps de rétention t_r :

c'est le temps écoulé entre l'introduction du composé dans la colonne et le moment où la substance sort à sa concentration maximale .

On parle du temps de rétention corrigé

$$t'_r = t_r - t_0$$

t'_0 : appelé temps mort c'est le temps qui s'écoule pour qu'un produit non retenu traverse le circuit chromatographique .

2 / - Facteur de capacité :

Il représente la manière dont un composé est retenu sur une colonne exprimé comme suit :

$$K' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Plus il est grand , plus le composé est retenu .

3 / - Sélectivité :

Le facteur α caractérise la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2 , défini par la relation :

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

4 / - Nombre de plateaux théoriques : efficacité d'une colonne

l'efficacité est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux N contenus dans la colonne . Ce nombre est calculé à partir du chromatogramme obtenu :

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_r}{\delta} \right)^2$$

w : largeur du pic à la base

δ : largeur du pic à mi-hauteur .

La connaissance de N et la longueur de la colonne nous permet d'en déduire l'hauteur équivalente d'un plateau théorique :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N}$$

5 / - Résolution :

Elle désigne l'aptitude que possède un système chromatographique à séparer les constituants d'un mélange . Aisément mesurable du chromatogramme en appliquant la formule :

$$R_s = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2}$$

V . 5 / - Analyse quantitative :

L'évaluation repose sur la mesure de propriétés des constituants . Ces propriétés mesurables sont exprimées avec des grandeurs .Le résultat le plus souvent une concentration C est proportionnelle à l'aire du pic chromatographique selon la fonction $C = f . A$

L'estimation des concentrations correspondantes aux aires mesurés s'effectue suivant différentes méthodes.

V.6/-Travaux Antérieurs

Le tableau suivant indique quelques travaux de dosage de l'AMPICILLINE réalisés par HPLC.

Tableau.3.

Année	Nature de l'échantillon	Méthode de traitement	Méthode d'analyse	Conditions opératoires	Référence
1988	Milieu normal		HPLC	Phase fixe : HP RP-8 (10 μ m, 20cm x 4,6mm) Phase mobile : MeOH / KH ₂ PO ₄ 0,067M (38 : 62 V/V) élution isocratique Détection : 240nm Etalon interne: PenecillinV	[13]
1993	Plasma	Extraction	HPLC	Phase fixe : Hyper sil 50Ds (150 x 4,6mm) Phase mobile : Acetonitrile / KH ₂ PO ₄ 0,067M (1 :9 V/V) Détection : 240nm Débit : 1 ml / min Etalon interne: Cephalexin	[14]
1978	Urine Plasma Salive	Extraction	HPLC	Phase fixe : lichrosob RP-8 (5 μ m) Phase mobile : MeOH / KH ₂ PO ₄ (0,067M, pH =4,6) Débit : 1.2 ml / min Détection : 225nm	[15,16]
//	Sérum	//	//	Phase fixe : lichrosob RP-8 (5 μ m) KH ₂ PO ₄ (pH =4,6) Concentration minimal mesurée : 0,5 μ g / ml	[15,17]
1996	Milieu normal		HPLC	Phase fixe : C8(150mm x 3.9m) Sentry guard column : 3.9mm x 20mm 10 mM acétate de sodium pH = 4 / Acetonitrile (92 :8) Débit : 1 ml / min Détection : 230nm Volume d'injection : 20 μ l	

CHAPITRE VI

**Les méthodes
d'analyse
utilisées**

VI/ - Les méthodes d'analyses utilisées :**VI . 1 / - Chromatographie sur couche mince CCM :****Principe :**

C'est une méthode très utilisée à cause de sa simplicité, rapidité et les très bonnes séparations qu'elle permet.

Les phénomènes de séparation mis en œuvre varient avec la nature de la phase stationnaire déposée sur un support rigide (verre) ou souple (aluminium ou plastique) qui selon les cas fonctionne comme une surface d'absorption ou comme support de liquide.

VI . 2 / - Chromatographie en phase gazeuse CPG :**Principe :**

Son principe consiste à vaporiser le mélange de composés à analyser et à la passer par un gaz vecteur (He, Ar, N₂, H₂) dans une colonne contenant la phase stationnaire. Les divers constituants sont séparés du mélange suivant leurs points d'ébullition et détectés par un signal qui est amplifié puis enregistré [4].

VI. 3 / - Spectroscopie infra - rouge (IR) :

Principe :

Elle est fondée sur l'absorption de photons h permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules.

Cette lumière n'est absorbée que si le moment dipolaire change avec la vibration.

On distingue dans les vibrations deux types principaux une de valence et autre de déformation [10].

VI. 4 / - Spectroscopie UV :

a) - Principe :

L'absorption de cette radiation conduit à une modification de l'état électronique de la molécule (les électrons de valence passent sur une orbite plus énergétique).

Seules les molécules possédants des groupements chromophores ou bien d'autres groupements auxochromes absorbent cette lumière [10].

b) - Loi de Beer-Lambert :

Cette Loi n'est valable que pour des solutions diluées et exprimée par :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon . c . d = \log \frac{1}{T}$$

A : Absorbance.

I_0 : Intensité de la lumière incidente.

I : Intensité de la lumière transmise.

ϵ : Coefficient molaire d'extinction.

c : Concentration molaire de la solution.

d : épaisseur de couche.

T : Transmission.

CHAPITRE VII

Validation d'une méthode d'analyse

VII/-Validation d'une méthode d'analyse :

VII.1/ - Définition :

La validation correspond à une étude scientifique des critères de fiabilité d'une méthode analytique . Elle a pour objectif de démontrer les performances de cette méthode de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont valides , et ce dans des limites bien définies [19, 20] . Ces critères sont les suivants :

- Linéarité .
- Spécificité .
- Répétabilité .
- Reproductibilité .
- Limite de détection.
- Intervalle de dosage .

VII.2/ - Critères de la validation :

1/ - Spécificité :

Une procédure est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser .

2/ - Sélectivité :

La sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

3/ - Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner .

Son étude revient à l'étude de régression . Les valeurs expérimentales (X=concentration et Y = réponse ou surface) sont reportés sur un graphe .

Elles permettent de tracer la droite de régression dont l'équation est de forme :

$$Y=aX+b$$

$$a = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{N}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}} \quad (\text{ pente de la droite })$$

$$b = y - ax = \frac{\Sigma y}{N} - a \frac{\Sigma x}{N} \quad (\text{ ordonnée à l'origine }) .$$

On peut calculer aussi le coefficient de corrélation à partir de l'expression suivante :

$$R = \frac{\Sigma x^2 - \frac{\Sigma x \Sigma y}{N}}{\sqrt{\left(\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N} \right) \left(\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} \right)}}$$

4 / - précision (fidélité) :

Elle représente la qualité de l'accord dans une zone définie de valeurs à mesurer [19] entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle peut être évaluée en deux niveaux : La répétabilité et la reproductibilité.

a) - Essai de répétabilité :

C'est l'expression quantitative de la précision en appliquant la méthode dans des conditions suivantes :

- même opérateur.
- même échantillon.
- même laboratoire.
- même appareillage et réactifs.
- même séries d'analyses.

b) - Essai de reproductibilité :

Ces essais fournissent à l'expérimentateur différentes expressions de la précision tenant compte à la fois des différentes conditions de réalisation de la

méthode et des différentes conditions de réalisation de la méthode et des diverses définitions du type de reproductibilité (intra laboratoire et inter laboratoire).

Expression de la précision :

A partir d'une série de mesures, qui ont fourni des valeurs $X_1, X_2,$

X_3, \dots, X_n la moyenne \bar{X} de cette série est :

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n}$$

L'écart type est calculé par la relation :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Le coefficient de variation

$$C_v = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100$$

5/ - Limite de détection :

Il s'agit de la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée .

6/ - Intervalle de dosage :

C'est la région pour laquelle il a été démontré que la procédure est approprié quant à sa fidélité , son exactitude et sa linéarité en utilisant la méthode décrite .

PARTIE PRATIQUE

I/- Le but :

Le but de notre travail expérimental est la mise au point d'une méthode de dosage de l'Ampicilline dans un milieu biologique.

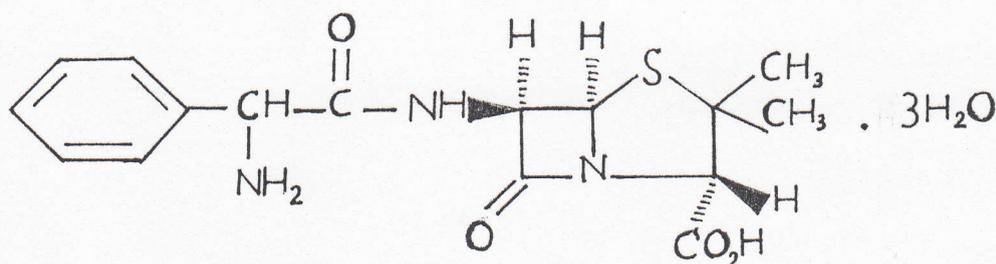
II/ - Contrôle de qualité de la matière première :**II.1/ Caractéristique générale :**

Au cours de notre travail , on a choisi la forme trihydratée comme matière première, elle a les caractéristiques générales suivantes :

L'Ampicilline : l'acide (2S, 5R,6R) – 6 – [(R)-2- amino-2- phenylacetamido] -3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique tri hydrate.

- Formule brute : $C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$

- Formule développée :



- Poids moléculaire 403.5g/mole.

Les tests d'identification et d'authentification se sont révélés conformes aux recommandations de la pharmacopée. Les résultats sont

GROUPE SAIDAL.

Centre de recherche et de développement

C.R.D

Laboratoire de chimie analytique

Bulletin d'analyse .

Nom du produit : Ampicilline , 3H₂O

Origine : Médéa

N° Lot : E0 2 99

Référence : Pharmacopée européenne

Tableau.4. (21)

Paramètres testés	Normes	Résultats
Caractères	Poudre cristalline blanche	Conforme
Solubilité :		Conforme
Eau	Peu soluble	
Alcool		//
Ether	Pratiquement insoluble	
Solutions diluées d'hydroxydes alcalins	Se dissout	//
Spectrophotométrie IR	Spectre d'échantillon identique au spectre de référence	Conforme
Essais :		
Aspect de la solution	Opalescente	Conforme
pH	3,5-5,5	4,6

II.2/ Matériels et réactifs :

. Réactifs :

- Ampicilline trihydratée.
- Eau distillée obtenue par distillateur (BUCHI).
- Eau ultra pure obtenue par distillateur (BUCHI) et filtrée sur des millipores type GS de diamètre $0.22\mu\text{m}$.
- Acétonitrile de qualité pour HPLC (MERCK).
- Tampon phosphate (KH_2PO_4 +eau ultra pure).

. Appareillage :

- ultrason.
- pH mètre.
- Etuve (MEMERT).
- Balance analytique de précision SARTORIUS.
- Chromatographe type (SHIMADZU) équipé de :
 - contrôleur de débit .
 - une pompe.
 - un détecteur ultraviolet à longueur d'onde variable CBM-10A.
 - injecteur automatique.
 - enregistreur et intégrateur équipé de logiciel informatique.
 - colonne : C_{18} composée de silice .

micro poreuse greffée octadécyle. il s'agit de SUPELCOSIL LC-18 25 Cm
-4,6m(DI) $5\mu\text{m}$.

III/ – Mise au point de la méthode de dosage :

Avant de commencer notre analyse, le contrôle de la qualité de la colonne est indispensable pour s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus après validité.

III.1 / - Contrôle de performance de la colonne C₁₈ :

(Voir annexe)

Les résultats obtenus sont :

Le facteur de sélectivité : $\alpha = 4.117$ (donc $\alpha > 1.5$)

Le nombre de plateaux théoriques : $N = 16481,5$ (donc $N > 1500$ plateaux)

Les valeurs N et α sont compatibles aux normes, la colonne utilisée conserve donc ses propriétés.

III.2 / - Choix des conditions opératoires :

1 / - Choix de la phase stationnaire :

Notre choix est porté sur la colonne C₁₈

2/ - Choix de la phase mobile :

Nous avons opté pour le système solution tampon / acetonitrile présentant une bonne allure du pic (Fig.4).

3/- Choix de la longueur d'onde maximale :

La longueur d'onde été fixée à 210nm.

Suite d' un balayage entre 210nm et 280nm, le maximum d'absorption est représenté à 210nm (Fig. 5).

D'après les tests effectués on choisi le système suivant :

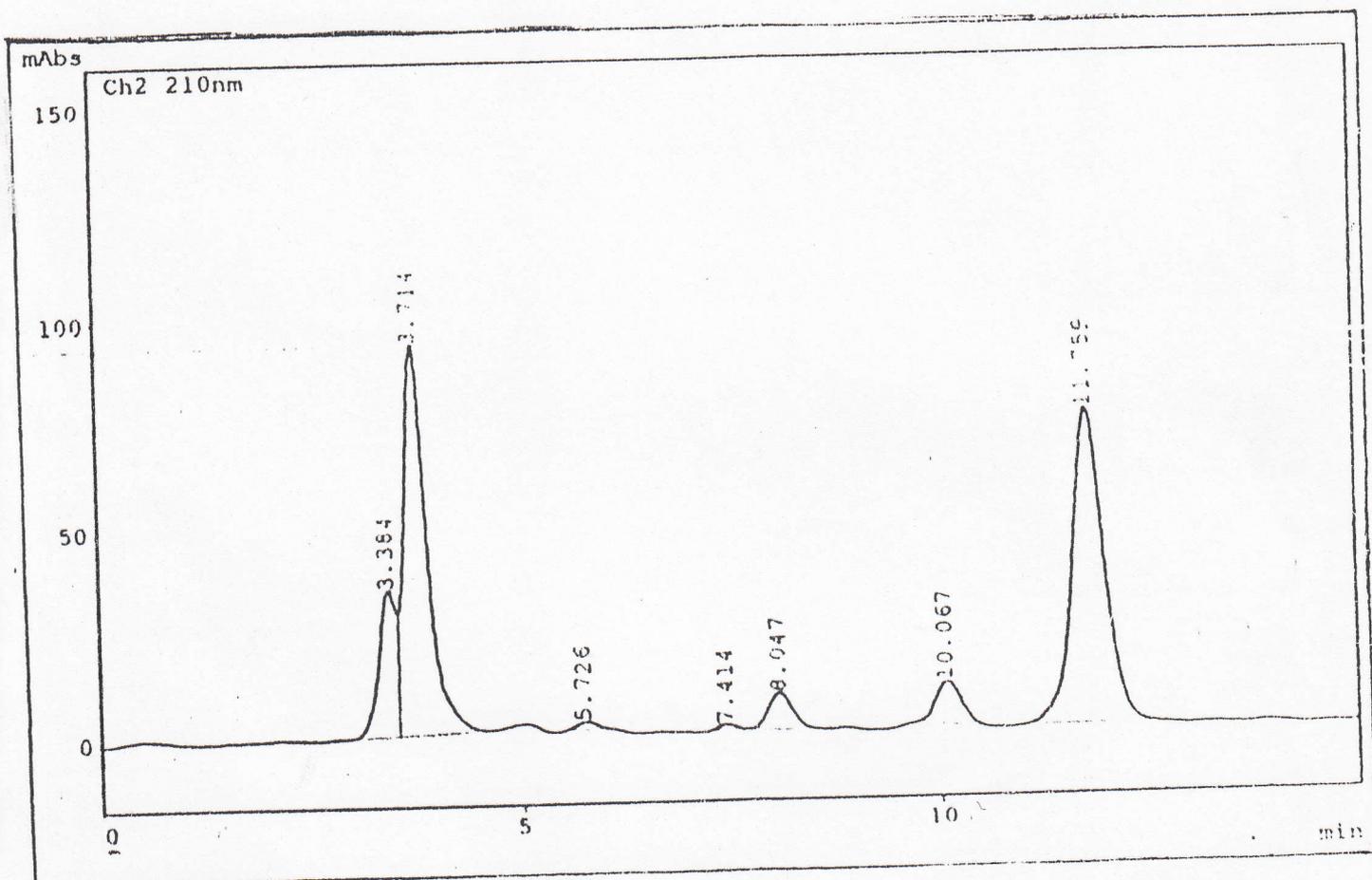


Fig.4 :Choix de la phase mobile

Colonne C₁₈
 Phase mobile Acetnitrile /Tampon phosphate.
 Longueur d'onde 210nm.
 Volume injecté 20µl.

III.3 / - Optimisation des conditions chromatographiques :

1/ - Influence de la polarité de la phase mobile :

La variation des proportions de la phase mobile (tampon + acetonitrile) influe considérablement sur le temps de rétention en l'augmentant ou le diminuant selon la polarité mais pas d'une façon linéaire (Fig.6) en variant la proportion de l'acetonitrile de 2% à 20%.

Les résultats sont récapitulés en tableau .5.

Tableau.5.

	Phase mobile		Tr de l'Ampicilline	Remarques
	CH ₃ CN (%)	Tampon KH ₂ PO ₄ (%)		
(1)	2	98	5.730	Mauvaise résolution.
(2)	8	92	11.688	Bonne résolution.
(3)	10	90	6.392	Interférence d'impureté.
(4)	15	85	7.55	Pic asymétrique avec traîné.
(5)	20	80	35.183	Pic fin mais très lent à apparaître.

Influence de la polarité de la phase mobile sur le temps de rétention

Temps de rétention (min)

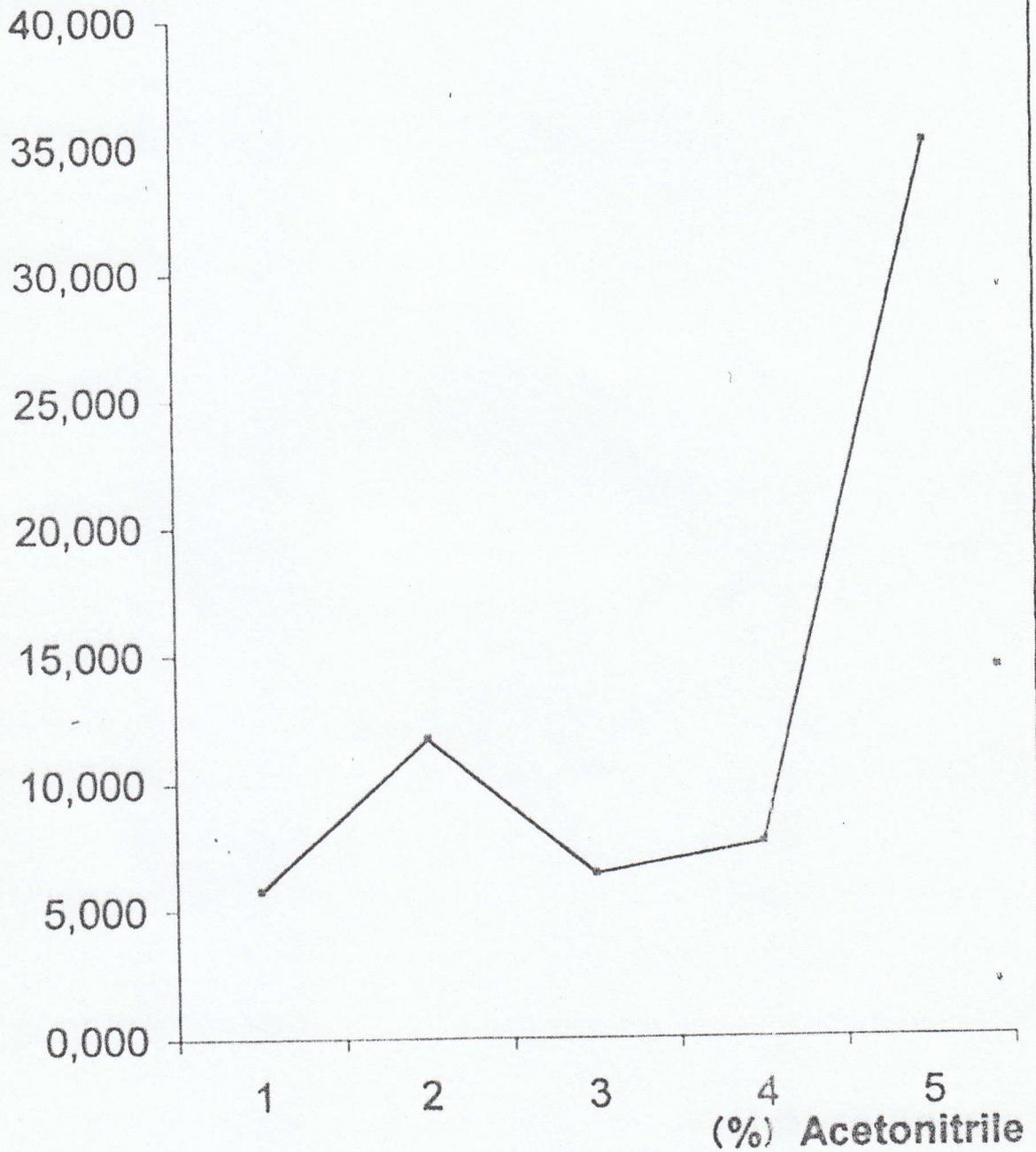


Fig.6

2/ - Optimisation du débit :

On a opté pour un débit de 1mL/min puisque son augmentation n'influe pas beaucoup mais un gain de temps appréciable est enregistré.

Enfin, nous avons retenu les conditions chromatographiques suivantes :

Colonne	C ₁₈
Phase mobile.....	Tompan KH ₂ PO ₄ 92%
Acetonitrile	8 %
Longueur d'onde.....	210nm.
Volume injecté.....	20µl.
Débit	1ml/min

III.3/ - Validation de la méthode :

Après avoir trouvé les conditions chromatographiques optimales, on passe à l'étude des critères de fiabilité de la méthode après une préparation d'une gamme de solution indiquée en Fig. 7a et Fig.7b.

1 - Spécificité :

On a injecté une solution contenant l'urine diluée à l'exception de l'Ampicilline (urine à blanc).

La figure (Fig.8) montre l'absence de tout pic au temps de rétention correspondant à l'Ampicilline.

2 - Sélectivité :

On a injecté une solution diluée d'urine chargée par l'Ampicilline.

On remarque l'existence de l'Ampicilline en présence d'autres composants de l'urine (Fig.9).

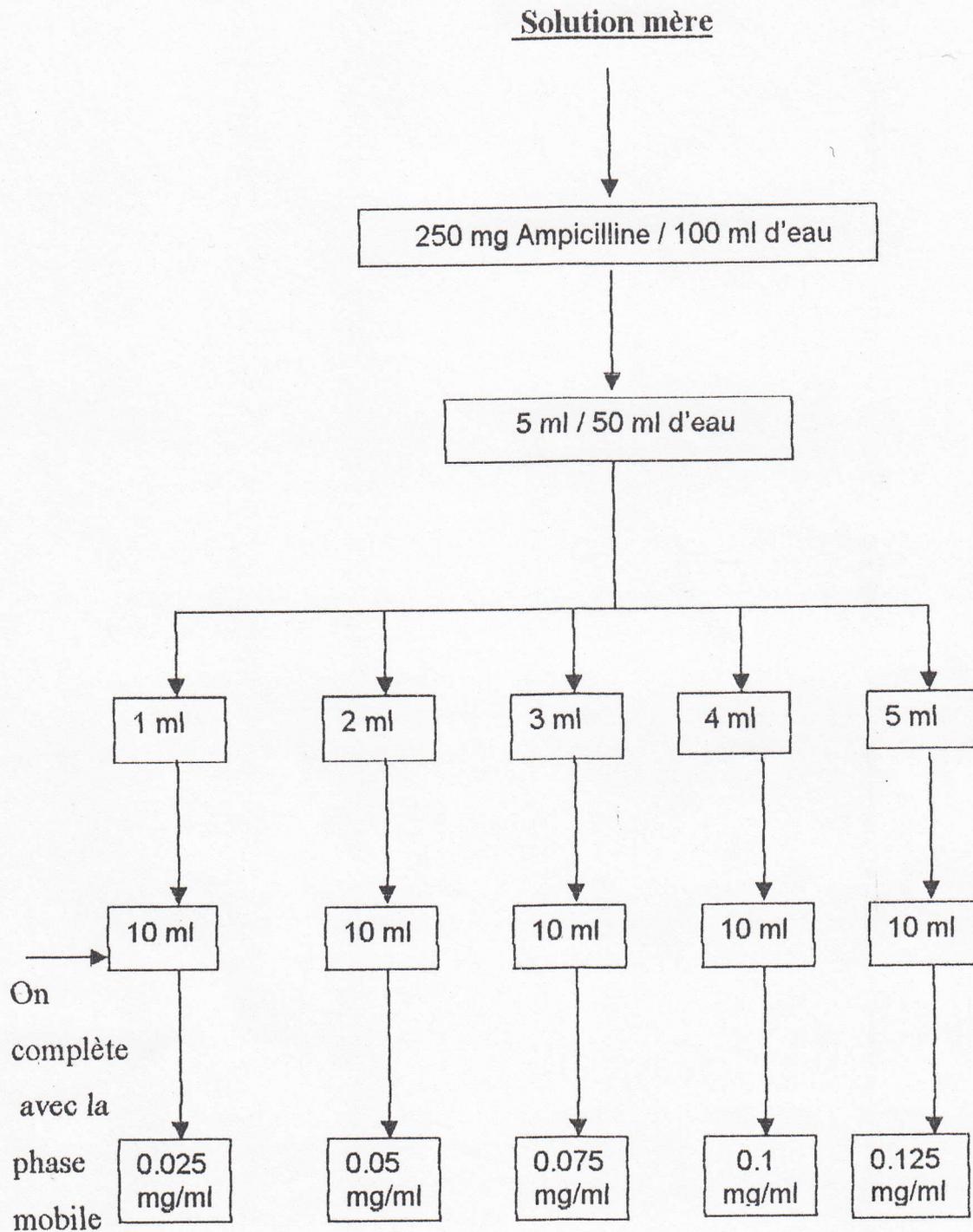


Fig.7a : la gamme des solutions à injecter au milieu normal

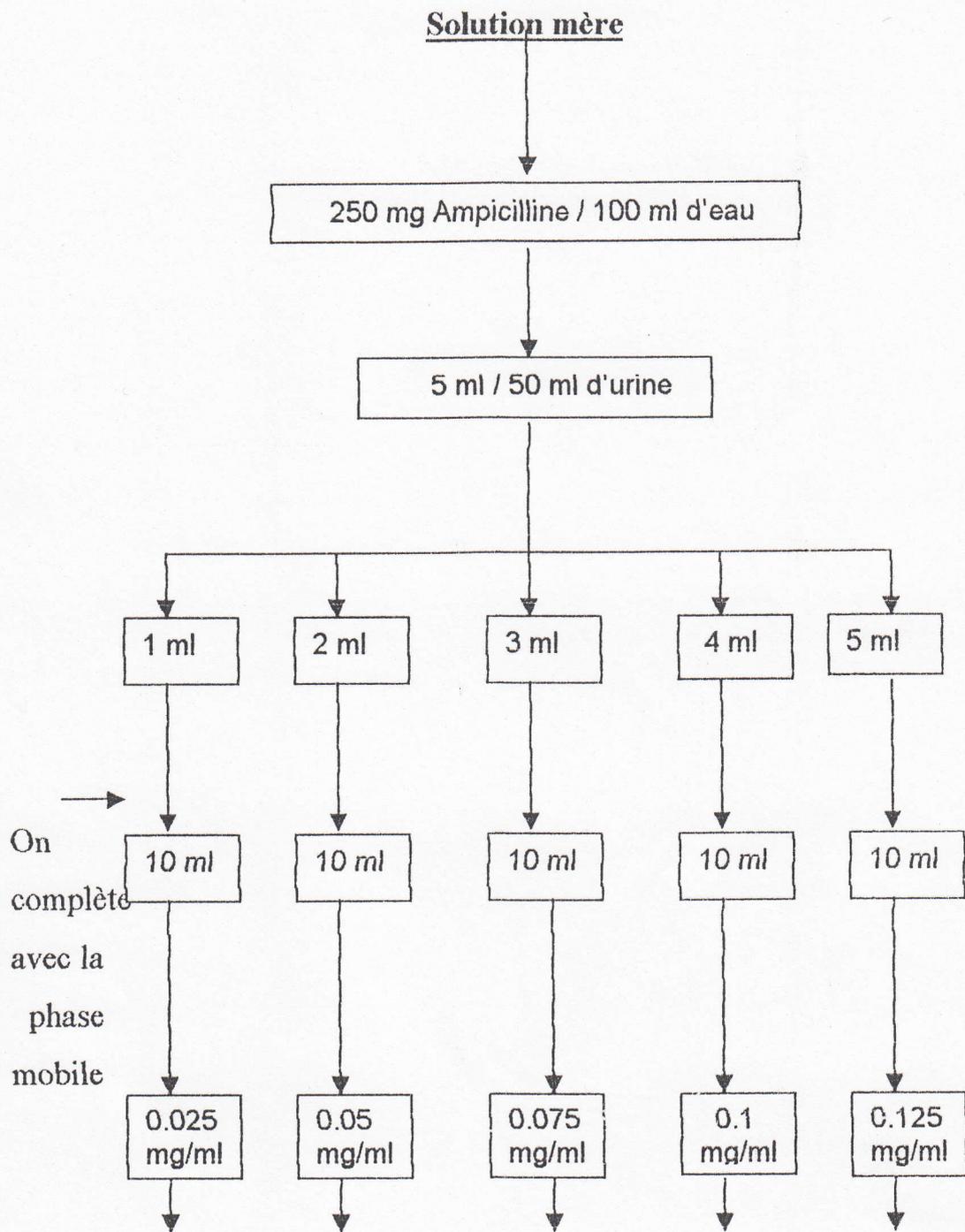


Fig. 7b : la gamme des solutions à injecter dans l'urine

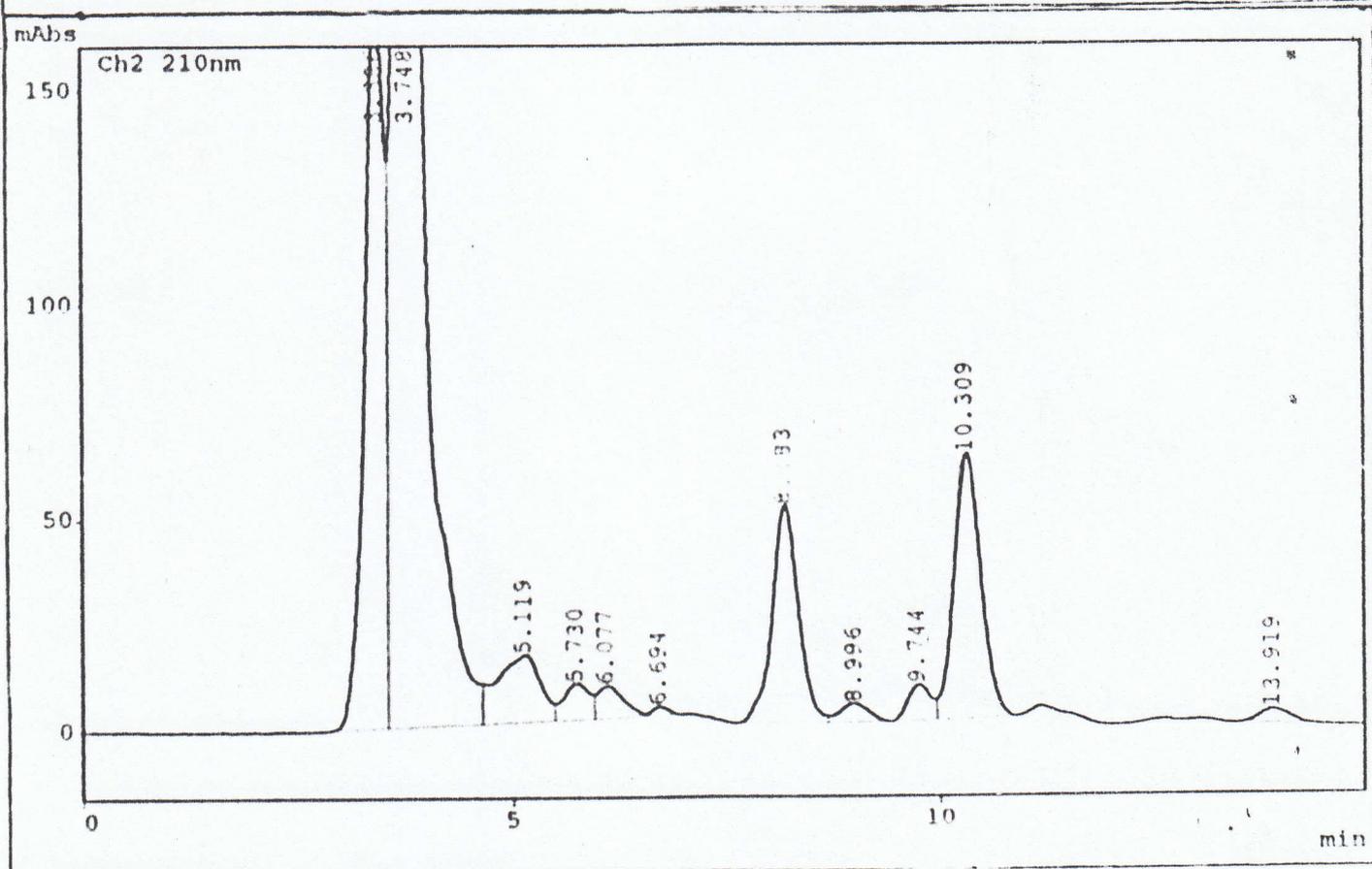
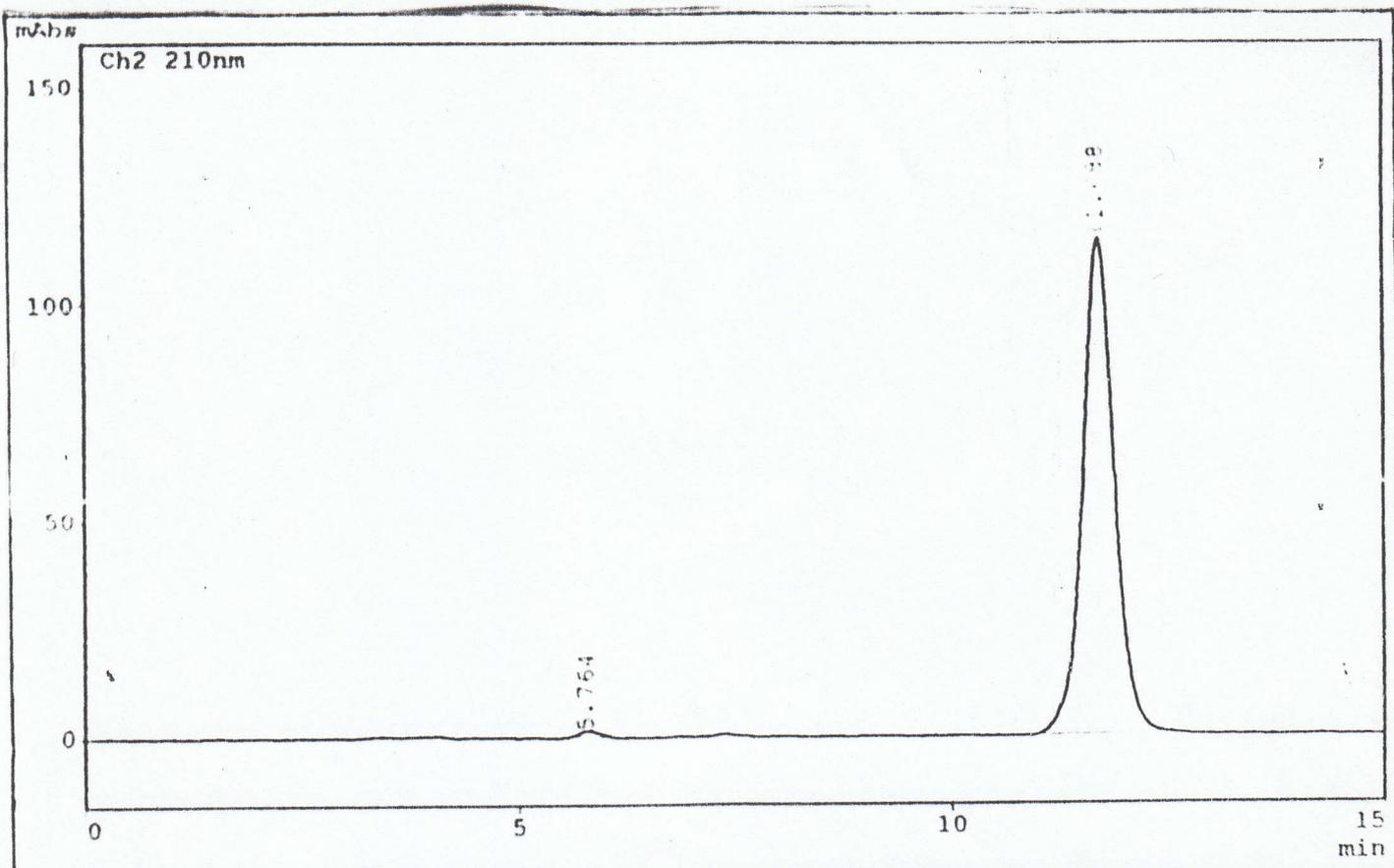


Fig.8 :Spécificité

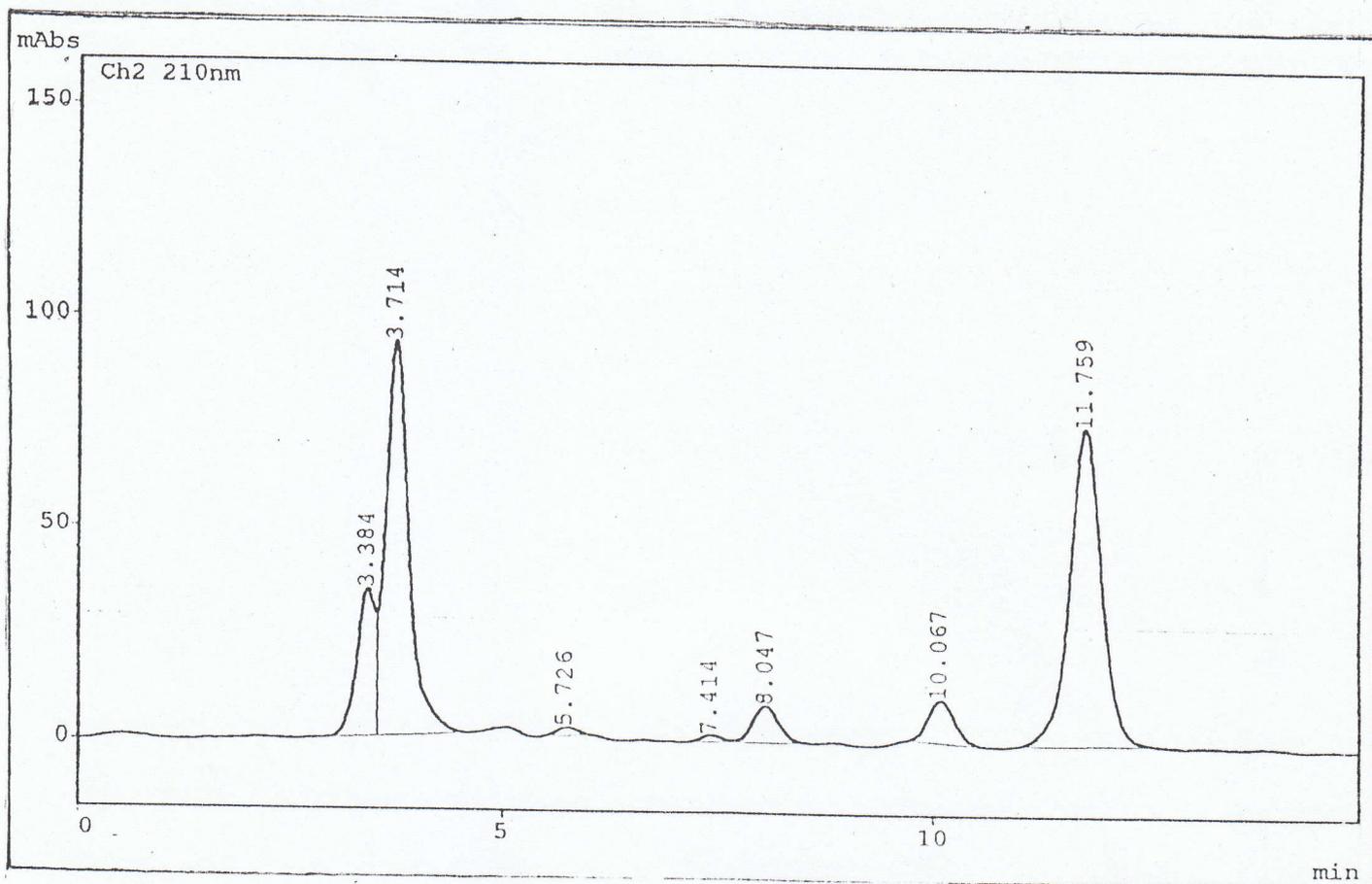


Fig.9 :Sélectivité

3 - Linéarité :

Cinq points de gamme ont été préparés dans deux milieux différents : milieu normal (phase mobile) et milieu biologique (urine).correspondant à des concentrations variant de 10%. 20%. 30%. 40%. et 50%.

Les résultats obtenus en (Fig. 10a et fig. 10b) sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6

N °	Concentration mg/ml	Surface de l'Ampicilline	Surface de l'Ampicilline + urine
1	0.025	980851	999778
2	0.05	1957695	1957633
3	0.075	2908243	3067725
4	0.1	3914941	4122459
5	0.125	4940728	5235752

L'équation de la droite dans la phase mobile (Fig.11) :

$$Y = 4E+07 x - 22608$$

Le coefficient de corrélation :

$$R = 0.9998$$

L'équation de la droite dans l'urine (Fig.11) :

$$Y = 4E+07x - 114363$$

Le coefficient de corrélation :

$$R = 0.9997$$

Y : surface du pic

X : concentration (mg/ml)

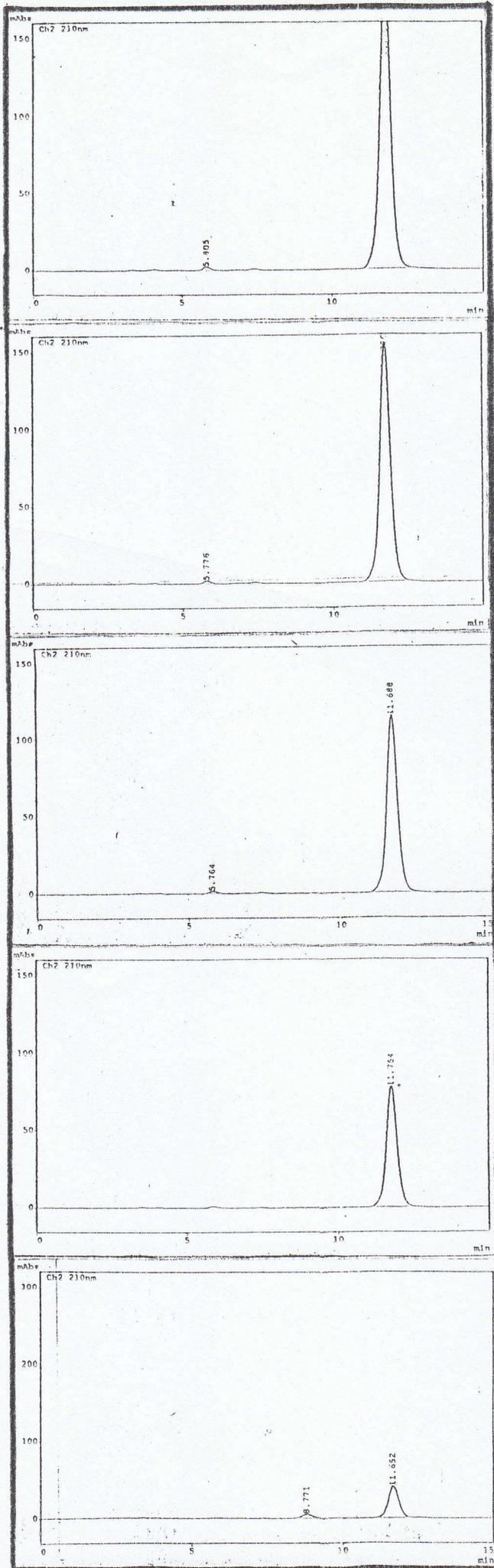


Fig. 16a : Fonction de réponse (Ampicilline)

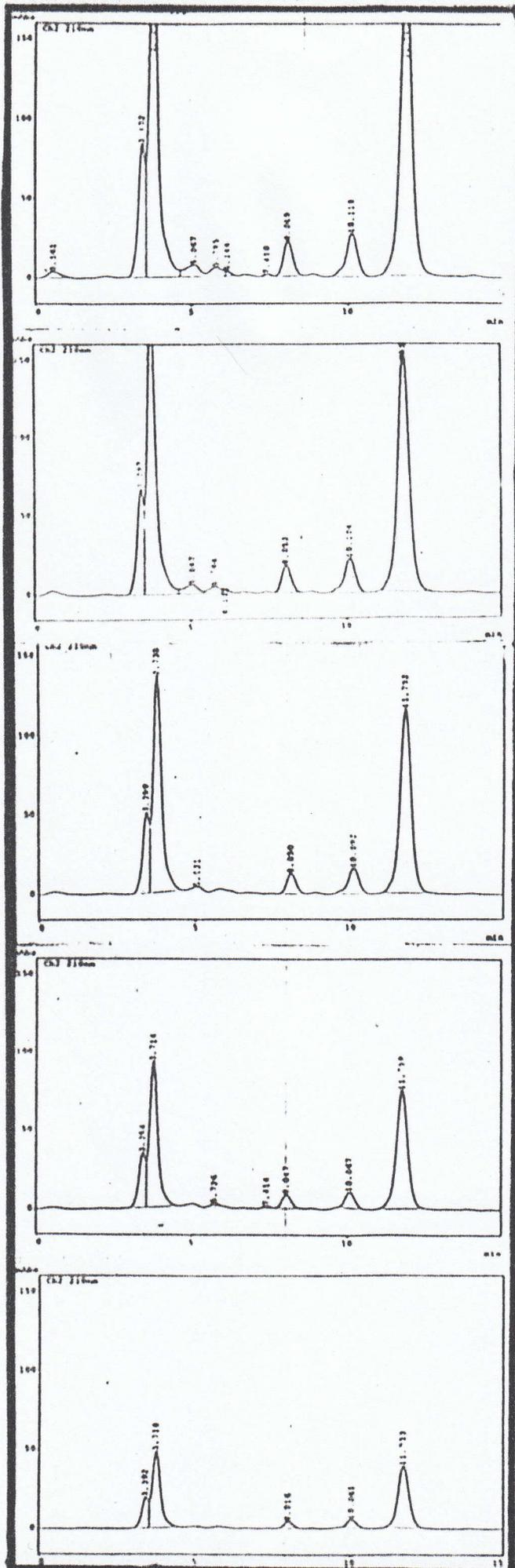


Fig.10 b :Fonction de réponse (Ampicilline + Urine)

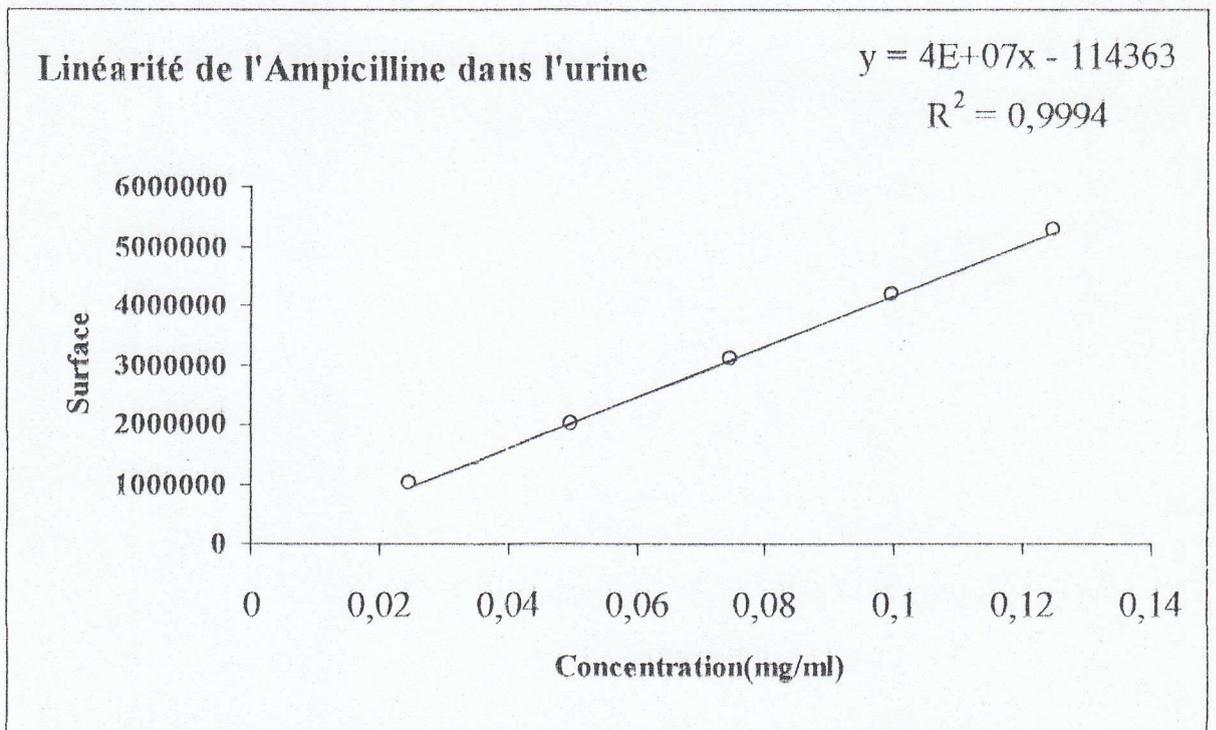
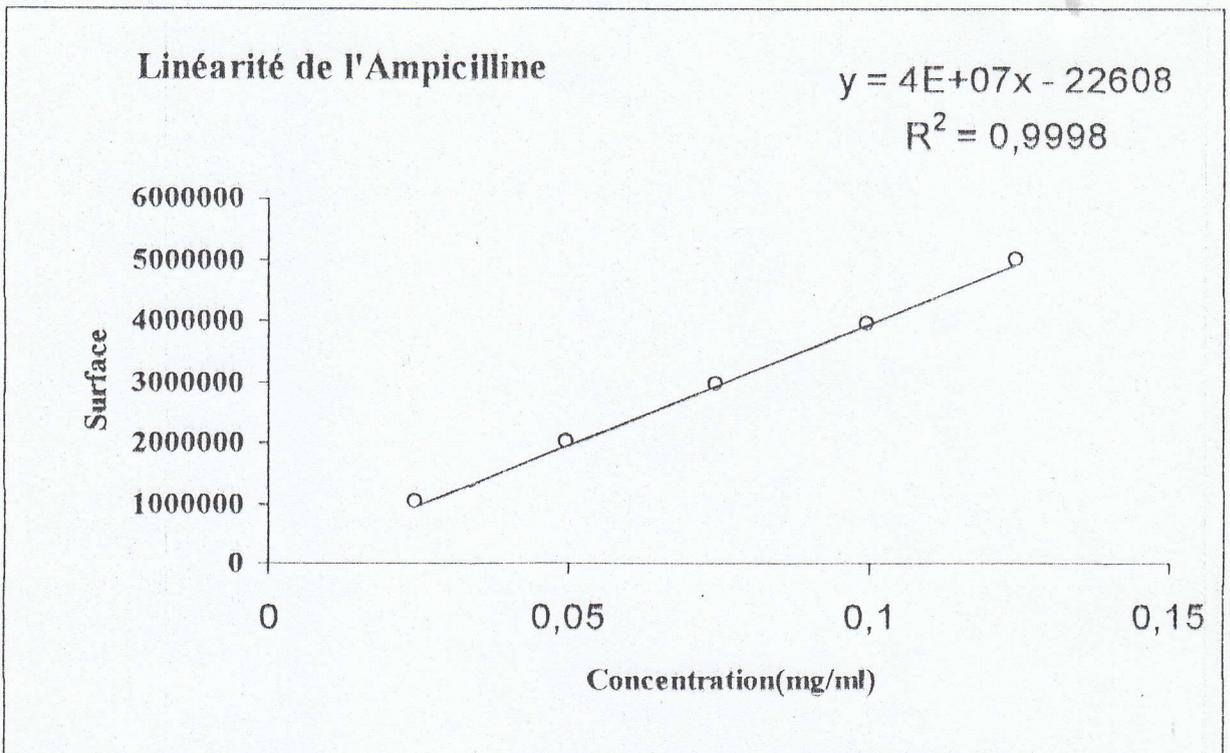


Fig.11

4- Précision :

Elle est évaluée par la répétabilité et la reproductibilité.

a) La répétabilité :

Grâce à l'injecteur automatique une solution contenant le principe actif à été injecté 10 fois dont les chromatogrammes sont reportés en Fig. 12.

Les surfaces des pics ont été déterminées pour une concentration de 0.075 mg/ml , on a calculé à partir de ces valeurs.

Les paramètres statistiques de base : la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation .Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

Tableau 7

Concentration	Essai de répétabilité	
	N° d'injection	Surface de l'Ampicilline dans la phase mobile
0.075 mg /ml	1	2903297
	2	2908307
	3	2917193
	4	2893355
	5	2903541
	6	2910863
	7	2911927
	8	2913678
	9	2896062
	10	2914730

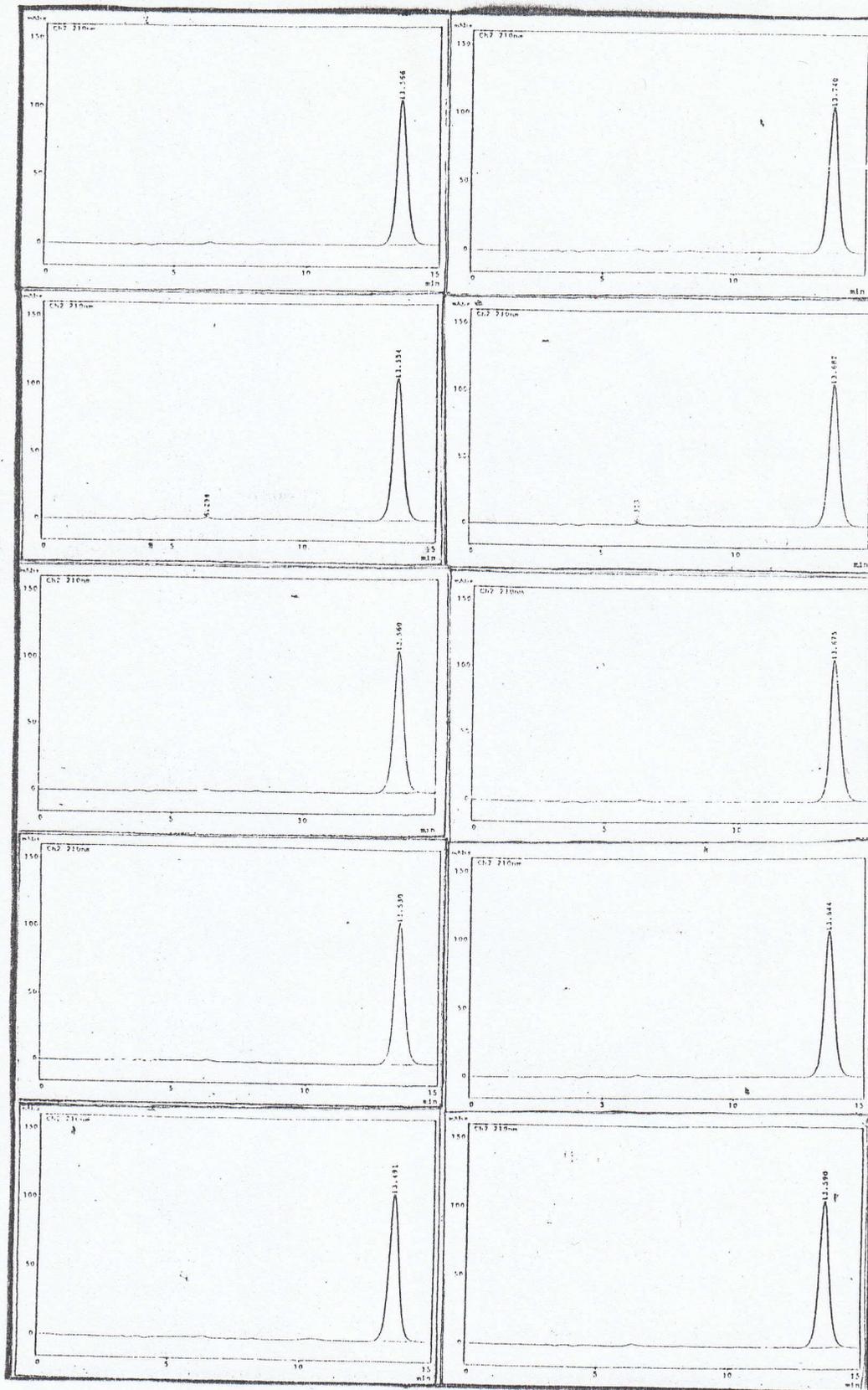


Fig.12 :Répétabilité

La surface moyenne : $S_{moy} = 2907295.3$

L'écart type : $\sigma = 8026.227$

Le coefficient de variation : $Cv = 0.276 \%$

b) La reproductibilité :

Nous avons préparé cinq jours de suite, une solution contenant le principe actif à la même concentration que celle de la répétabilité.

On a calculé à partir des surfaces des pics (Fig.13) les mêmes paramètres statistiques de base .Le tableau.8 résume les résultats obtenus :

Tableau 8

Concentration	Reproductibilité : Essai de 5 jours				
	Surface d'étalon				
	J	J+1	J+2	J+3	J+4
0.075 mg/ml	2853819	2862799	2861764	2861764	2875814

La surface moyenne : $S_{moy} = 2859756$

L'écart type : $\sigma = 11582.194$

Le coefficient de variation : $Cv = 0.405\%$

5 / - Limite de détection : 2,5 μ g/ml

Après une dilution de la plus faible concentration de l'étalon (Fig.14a), la limite de détection est choisie de façon à ce que le signal obtenu soit le double du bruit de fond de l'appareil (Fig.14b).

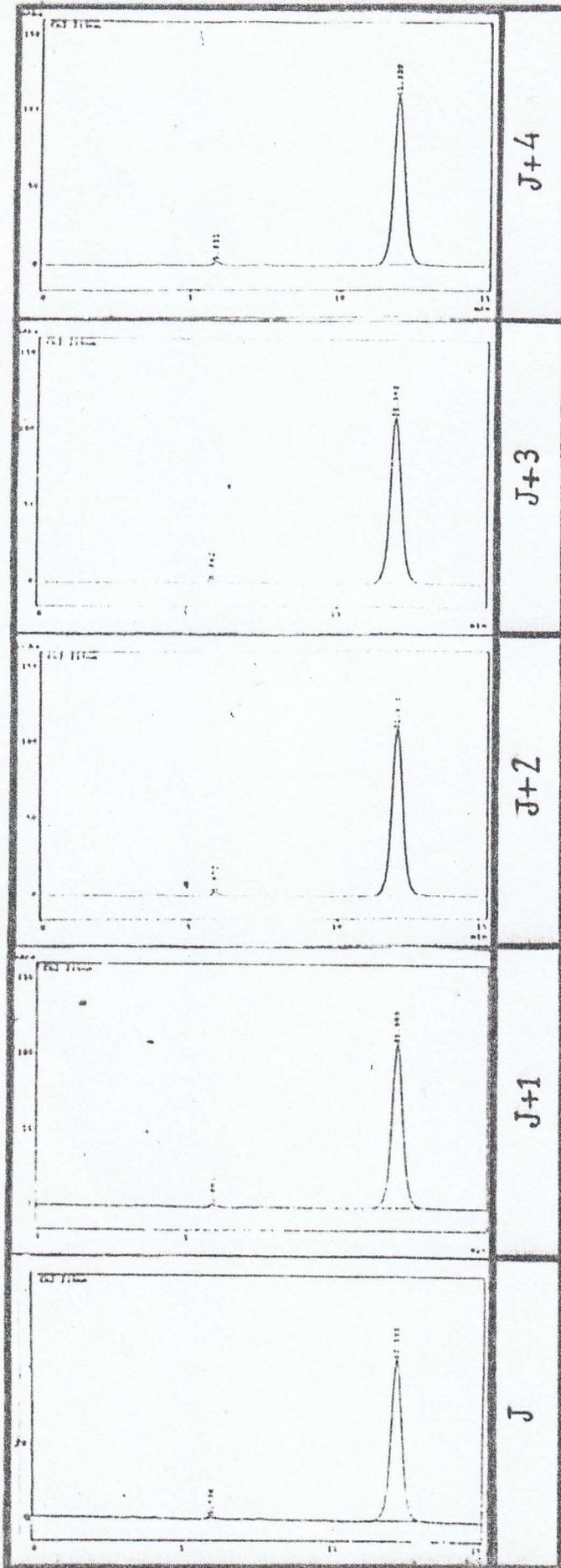


Fig.13 :Reproductibilité

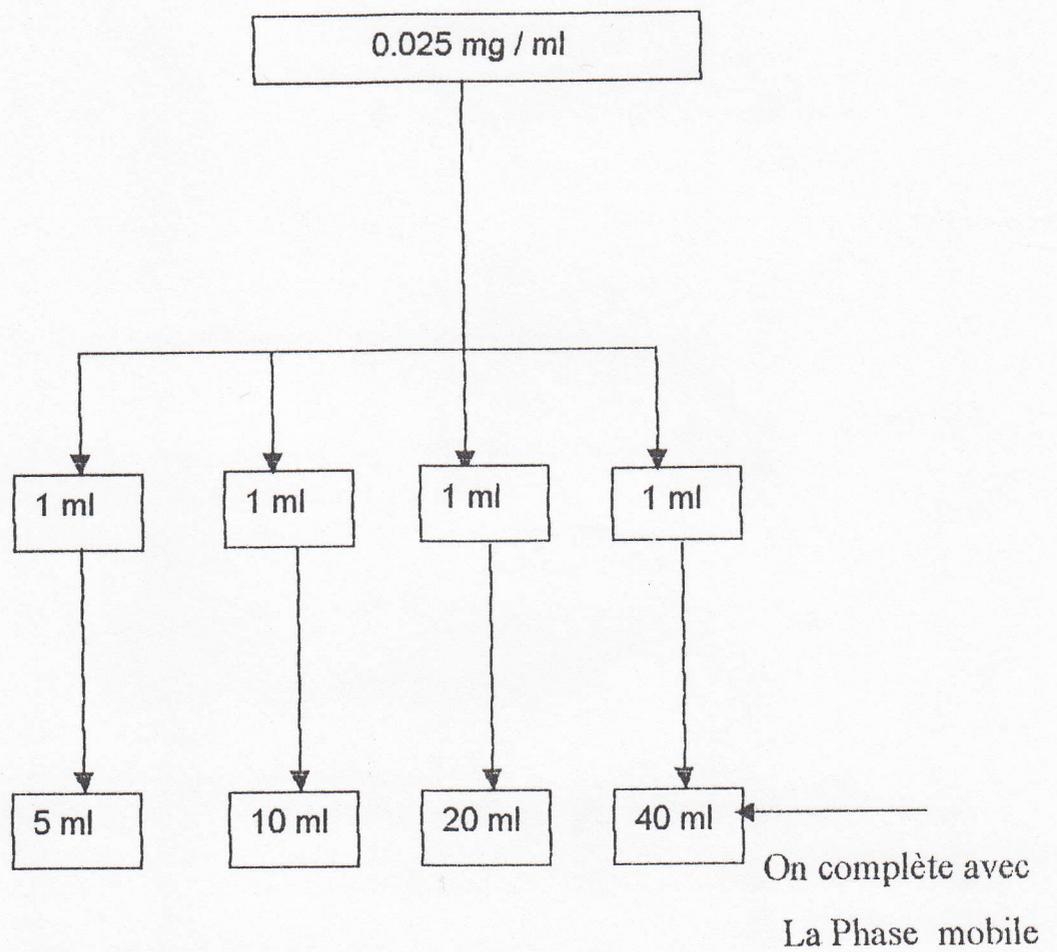


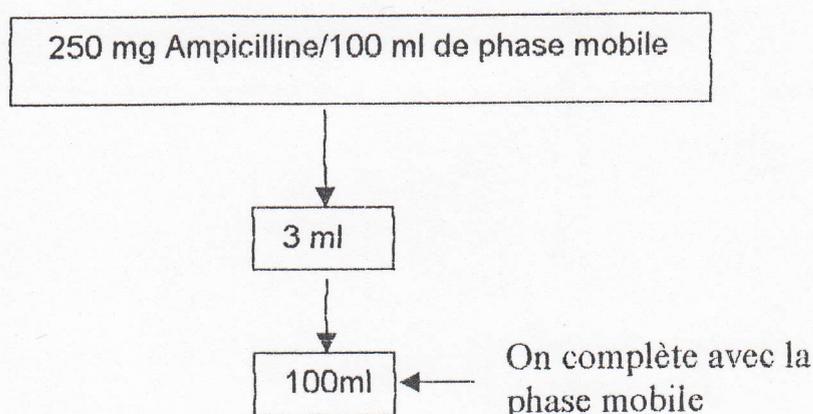
Fig. 14a .

6/ - Intervalle de dosage :

Dans le présent travail le domaine de confiance de la méthode est pour des concentrations de 0.1 à 0.8 d'après [19] .

IV/ - Application sur l'échantillon final :**a) - préparation de l'étalon :**

La procédure de préparation est comme suit :

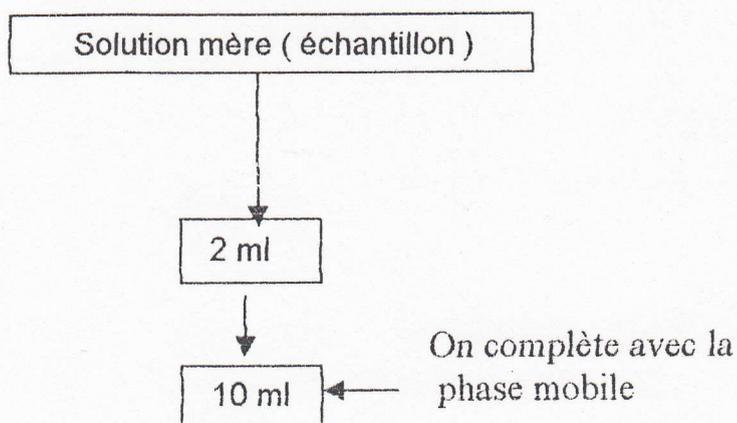


la concentration de l'étalon est de :

$$(250 \times 3) \div (100 \times 100) = 0.075 \text{ mg/ml}$$

b) - préparation de l'échantillon :

Après l'administration d'une gélule de 500 mg , on a récupéré un volume de 370 ml après 6 heures chez un sujet .La préparation de la solution mère de l'échantillon est de la manière suivante :



Les résultats obtenus (Fig.15) sont présentés dans le tableau suivant :

	Concentration (mg/ml)	surface	Quantité absorbée de l'ampicilline après administration d'une gélule de 500 mg.
Étalon	0.075	2862221	175 mg (puisque l'absorption est de 35%
Echantillon	$(x/370) \times 2/10$	2616624	

IV.1/ - Calcul :

Le titre x en (%) serait :

$$x = (2616524 + 2862221) \times 0.075 \times 370 \times (10 \div 2) \times (100 \div 175)$$

$$x = 72.48\%$$

IV.2/ - Interprétation :

Les normes de la quantité éliminée d'Ampicilline inchangée dans les urines varie de 70 à 80 % par rapport à la quantité absorbée [7].

Les résultats obtenus permettent de conclure que la quantité éliminée du médicament dans les urines après 6h d'administration et comprise dans la norme.

Par conséquent, notre méthode est validée car elle répond à tous les critères de validation.

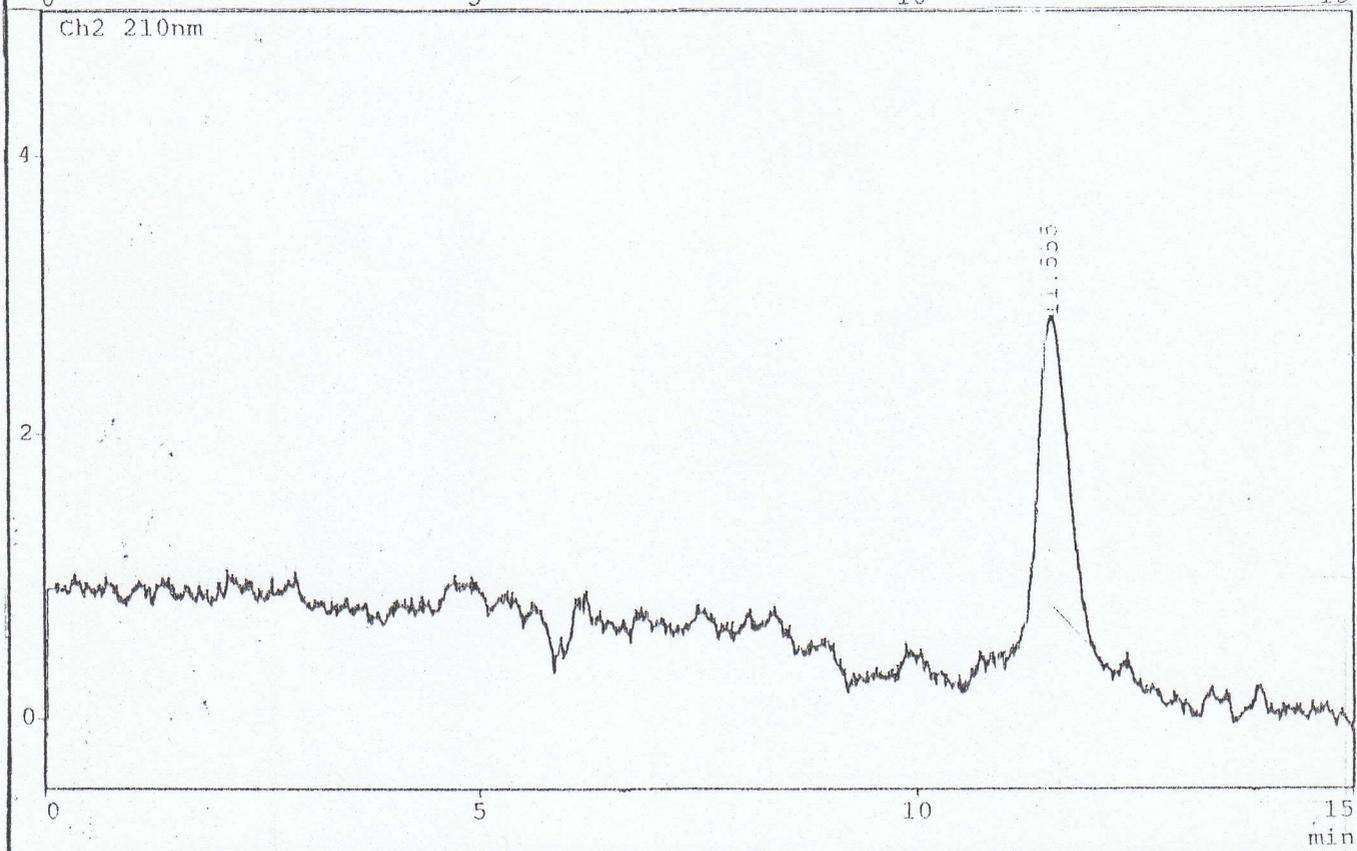
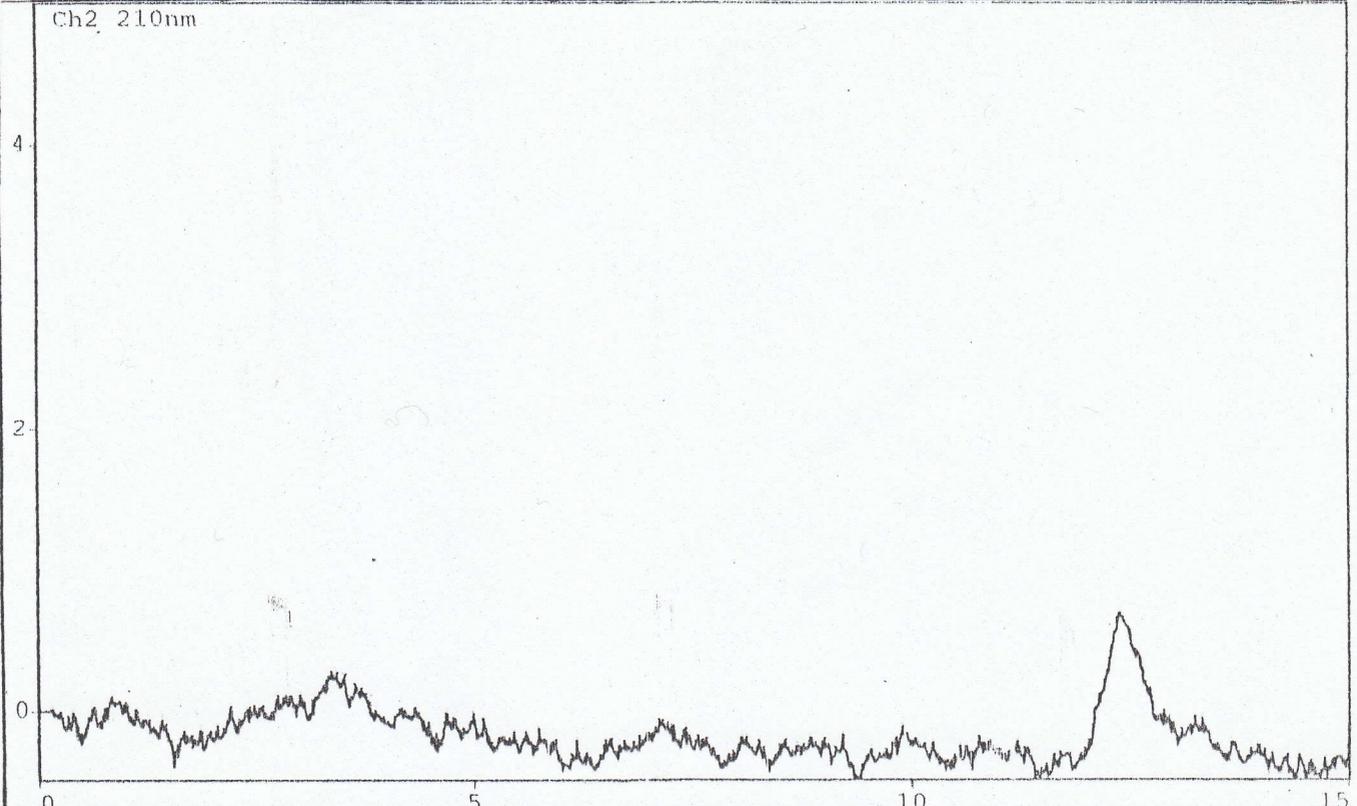


Fig.14 b :Limite de détection

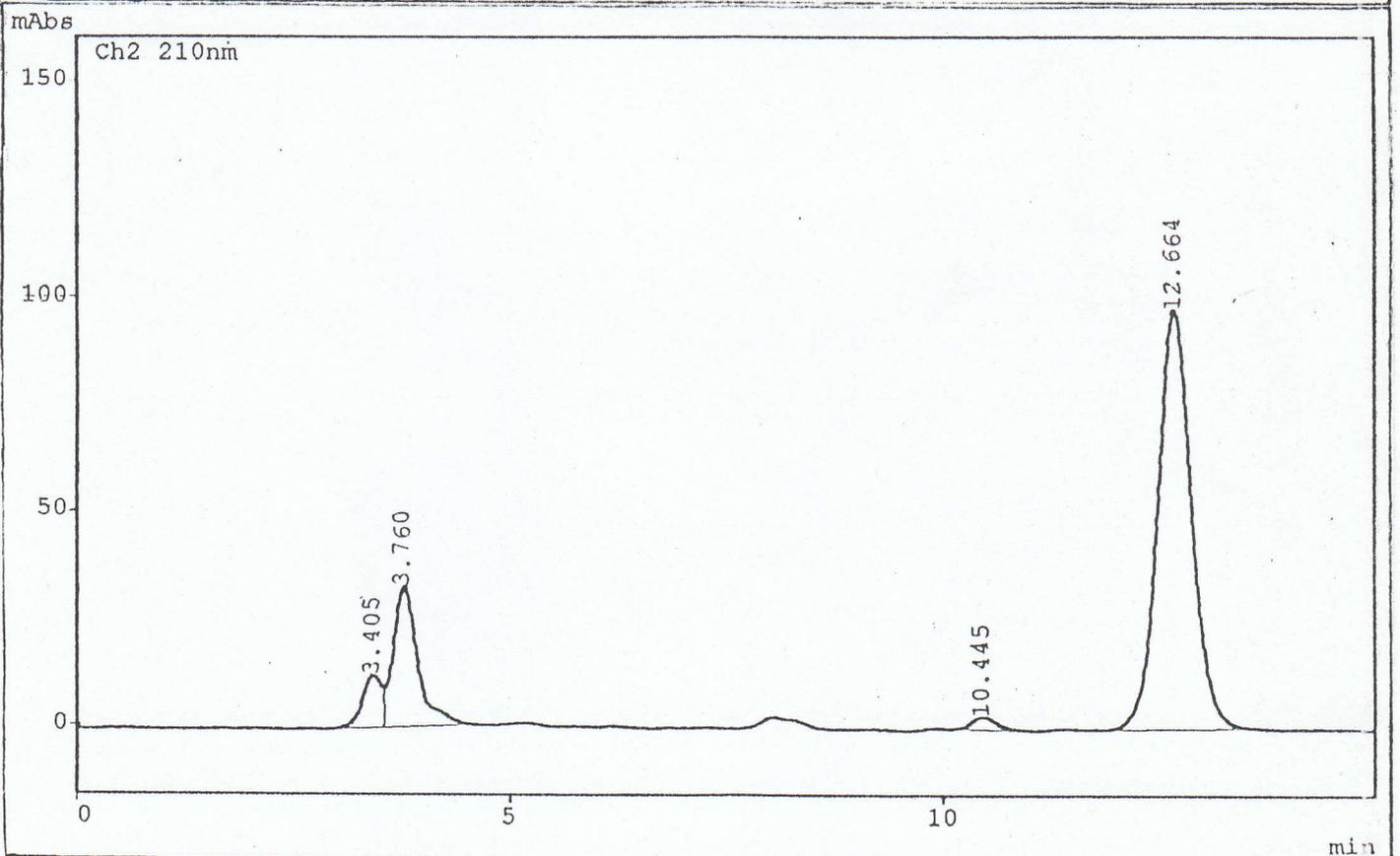


Fig.15 :Application sur échantillon final

Conclusion

CONCLUSION

En fin de cette étude, on peut conclure que :

La chromatographie liquide à haute performance est une méthode prédominante pour l'analyse des médicaments dans les milieux biologiques.

L'utilisation de la chromatographie à polarité de phase inversée, nous a permis d'identifier et quantifier sélectivement l'ampicilline dans les urines.

IL a été retenu les conditions optimales suivantes :

Phase mobile Acetonitrile 8% / Tampon KH_2PO_4 92%.

Phase stationnaire C_{18}

Débit 1 ml /min.

Longueur d'onde 210 nm.

Volume injecté 20 μl .

La validation de la méthode élaborée après l'évaluation statistique des résultats, prouve sa fiabilité.

En effet, il a été obtenu une linéarité avec un coefficient de corrélation de 0.999.

De bons coefficients de variations sont obtenus dans l'étude de la reproductibilité et de la reproductibilité ce qui montrent la bonne précision de la méthode proposée.

L'application de la méthode sur l'échantillon final permet de constater que la quantité de l'ampicilline éliminée dans les urines après 6 heures de son administration est comprise dans la norme.

IL est donc recommandé d'exploiter les résultats obtenus davantage afin d'améliorer la méthode, il serait aussi intéressant de faire le dosage aussi dans d'autres fluides comme le sang.

Sans oublier en fin l'avantage que j'ai tiré de ce modeste travail qui m'a permis de toucher de plus près la chimie, en particulier les méthodes d'analyses en mettant en pratique les connaissances acquises pendant mon cycle d'étude.

Glossaire

- **Bacille** : Organisme microscopique en forme de bâtonnet.
- **Bactérie** : Microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal.
- **Bioéquivalence** : Elle concerne les études liées directement à la comparaison entre les formulations pharmaceutiques.
- **Bio disponibilité** : Elle ne représente pas seulement la mesure de la résorption, c'est la fraction inchangée du médicament présent dans la circulation générale.
- **Clairance** : action d'épurer, purification (le sang, le rein) elle est aussi estimée.
- **Diagnostic** : Identification d'une maladie d'après ses symptômes.
- **Endogène** : Qui est produit au dedans de l'organisme, lui même c'est le contraire d'exogène.
- **Germe** : Stade simple et primitif d'où dérive tout être vivant.
- **Gram** : La réaction du gram consiste en une coloration de certains microbes. On dit de ceux qui fixent ces colorants qu'ils prennent le gram « gram positif ». Les autres qui ne prennent pas le gram « gram négatif ».
- **Médicament générique** : Un médicament générique est une copie d'un médicament original dont la production et la commercialisation rendues possibles par la chute des brevets, une fois écoulé la période légale de protection.
- **Métabolite** : Le métabolisme, ensemble des transformations chimiques et physiques subies dans un organisme vivant.
- **Pharmacocinétique** : Terme qui désigne le sort des médicaments dans l'organisme humain qui comprend : leur résorption, leurs transformations, leur élimination.
- **Pharmacodynamie** : La recherche des effets exercés par le produit sur les organes et systèmes (modifications morphologiques, physiologiques).

- **Pharmacologie** : Science des médicaments et de leur emploi.

- **Per os** : Per oral, qui est administré par **voie** buccale.

- **Sécrétion** : Action d'émettre un liquide organique.

- **Thérapeutique** : Relatif au traitement des maladies.

- **Spectre antibiotique** : L'ensemble des agents infectieux sensibles à l'action d'un antibiotique donné, il est déterminé expérimentalement.

ANNEXE

1 - CHAMP D'APPLICATION

La présente procédure décrit la manière de procéder au contrôle de la qualité d'une colonne de chromatographie liquide du type C8 ou C18. Elle doit être mise en oeuvre avant toute analyse ponctuelle et appliquée régulièrement au cours d'une étude afin de s'assurer que la colonne conserve ses propriétés.

En effet, la qualité de la colonne conditionne la fiabilité des résultats obtenus dans la réalisation des études ou des expérimentations scientifiques.

2 - DEFINITIONS

Les paramètres permettant d'évaluer et de suivre les performances des colonnes de chromatographie liquide sont essentiellement :

- le nombre de plateaux théoriques, défini par la relation :

$$N = \frac{T_r}{L/2}^2 \times 5,54$$

avec T_r : temps de rétention du pic considéré
 $L/2$: largeur à mi-hauteur du pic considéré

- le facteur de sélectivité, défini par la relation :

$$\alpha = \frac{K'2}{K'1}$$

$$K'2 = \frac{T_{r2} - T_{r0}}{T_{r0}}$$

$$K'1 = \frac{T_{r1} - T_{r0}}{T_{r0}}$$

La détermination de ces paramètres est obligatoire avant toute analyse devant conduire à des résultats soumis aux règles des bonnes pratiques de laboratoire. Le non respect de la procédure de test entraîne l'invalidation des résultats.

Les chromatogrammes ayant permis de déterminer les valeurs de N et de α avant la manipulation, doivent être datés, signés et archivés.

3 - MODE OPERATOIRE

A - CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

- Solvant : MeOH/H₂O 60/40
- Débit : 1,4 ml/mn pour les colonnes de 5 µm
1,2 ml/mn pour les colonnes de 3 µm
- Longueur d'onde : 254 nm
- Sensibilité : 0,1 unité de D.O. pleine échelle.
- Volume injecté : 20 µl
- Solution : solution de test toute prête

Préparation de la solution de test

Introduire 20 mg de parahydroxybenzoate de méthyle et 20 mg de parahydroxybenzoate de propyle dans 100 ml d'un mélange de 60 volumes de méthanol, 39 volumes d'eau et 1 volume d'acétone.

B - TEST DE LA COLONNE

Placer la colonne sur l'ensemble chromatographique utilisé et amener le débit à la valeur choisie en incrémentant lentement le système de réglage de la pompe. Ceci évite de mettre brusquement la phase stationnaire sous pression élevée et permet de prolonger la vie du lit de phase.

Laisser la colonne s'équilibrer pendant 20 minutes, puis vérifier que le système chromatographique est arrivé en équilibre en enregistrant la ligne de base. Si celle-ci est stable, procéder au test de la colonne.

Régler la vitesse de défilement du papier sur 2 cm/mn et l'atténuation de l'intégrateur et/ou du détecteur, de manière à ce que les pics atteignent 70 p. cent du déplacement maximum possible. Enregistrer le chromatogramme.

C - CALCULS

Le chromatogramme doit théoriquement faire apparaître 3 pics. Le premier de ces pics est le pic dit de "volume mort", représentant le temps d'éluion d'un composé non retenu, dans ce cas l'acétone. Le second pic est le pic de parahydroxybenzoate de méthyle, le troisième pic est le pic de parahydroxybenzoate de propyle.

Soient :

Tr0 le temps de rétention du 1er pic
Tr1 le temps de rétention du 2ème pic
Tr2 le temps de rétention du 3ème pic

Calculer :

$$K'1 = \frac{Tr1 - Tr0}{Tr0} \quad K'2 = \frac{Tr2 - Tr0}{Tr0} \quad \alpha = \frac{K'2}{K'1}$$

Puis déterminer L1/2 = largeur du 3ème pic à mi-hauteur (en mm).

Tr2 = temps de rétention du 3ème pic (en mm).

Calculer le nombre de plateaux théoriques

$$N = \left(\frac{Tr2}{L1/2} \right)^2 \times 5,54$$

5 - RESULTATS

Le nombre de plateaux efficaces mesuré par cette technique ne doit pas être inférieur à 1500.

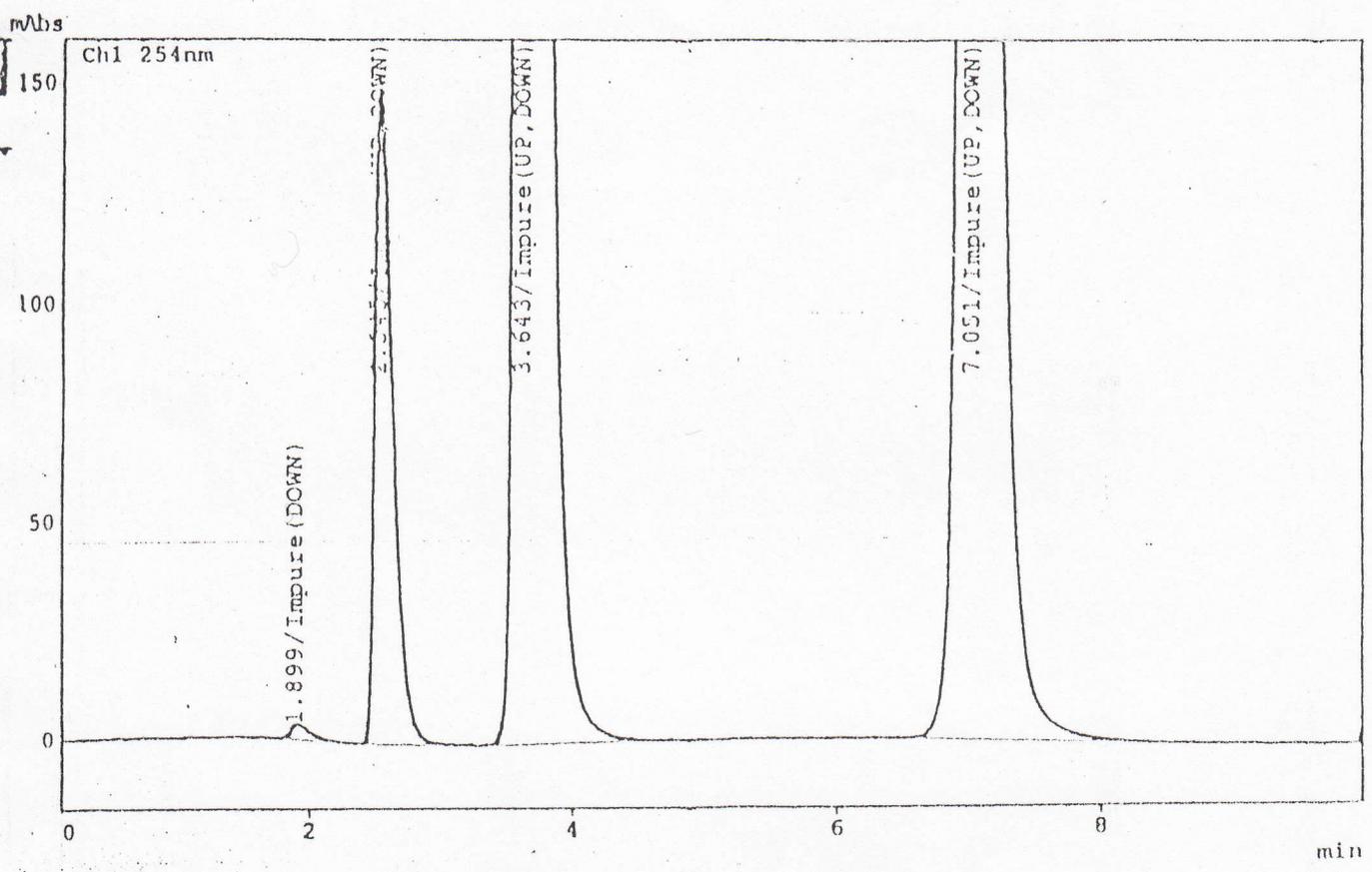
Si la valeur calculée est effectivement inférieure, recommencer le test une seconde fois.

Le facteur de sélectivité α ne devra pas être inférieur à 1,5.

Si les valeurs de N et de α sont toutes deux inférieures aux normes, la colonne sera mise au rebut.

Sample : nipagine/nipaso101
Volume : 20
Type : Unknown
Detector : SPD-M10AV
Operator : karim
Method Name : NPG01.M01

Chromatogram ***



Peak Report ***

NO	CHNO	TIME	AREA	MK	PURITY.UP	PURITY.DOWN	IDNO	CONC
1	1	1.899	37901					0.1199
2	1	2.545	1424787					4.4964
3	1	3.643	15961048					50.3704
4	1	7.051	14263556					45.0134
								31607372
								100.0000

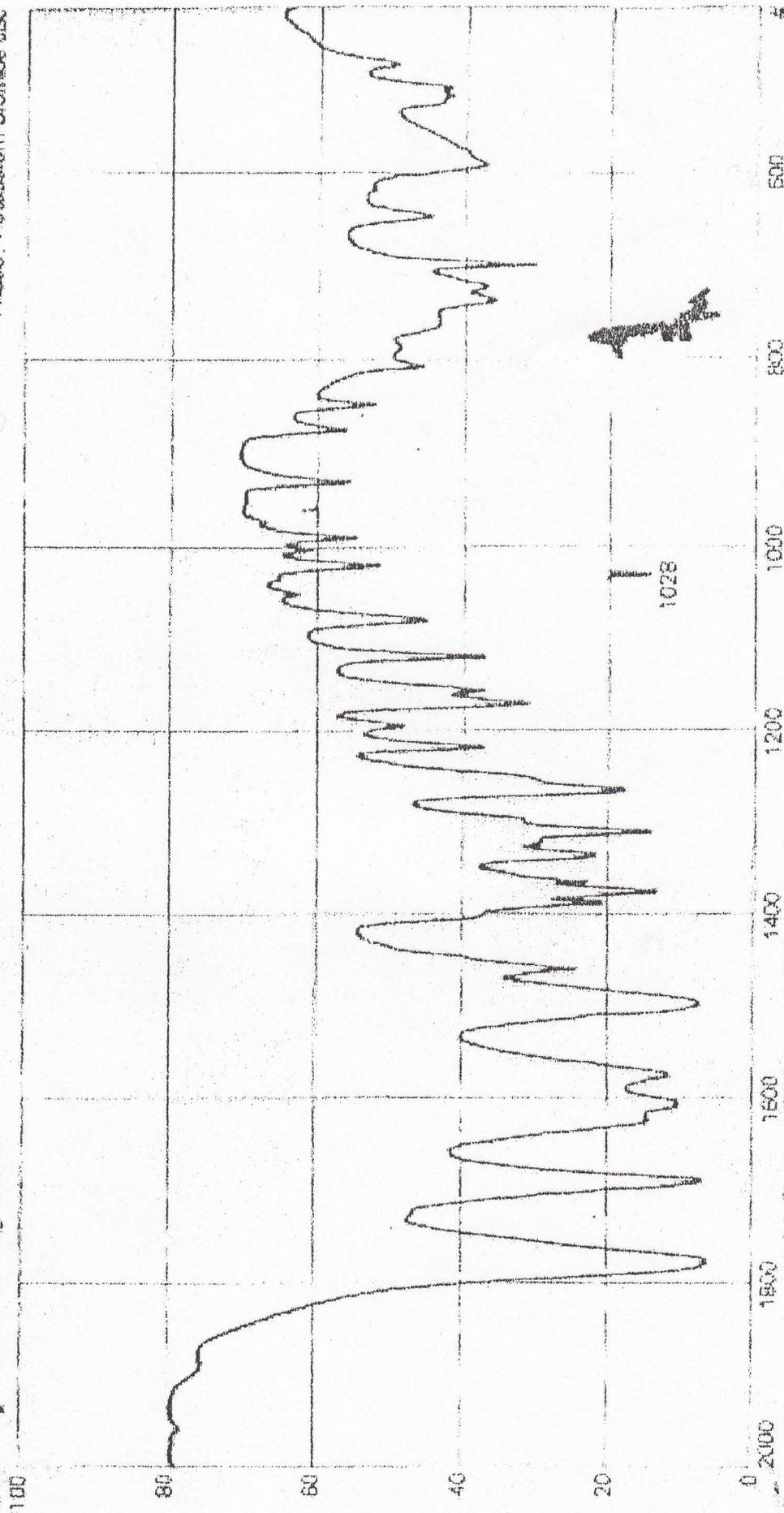
Library Search Result ***

Peak Purity Information ***

S8 Infrared Reference Spectra (22)

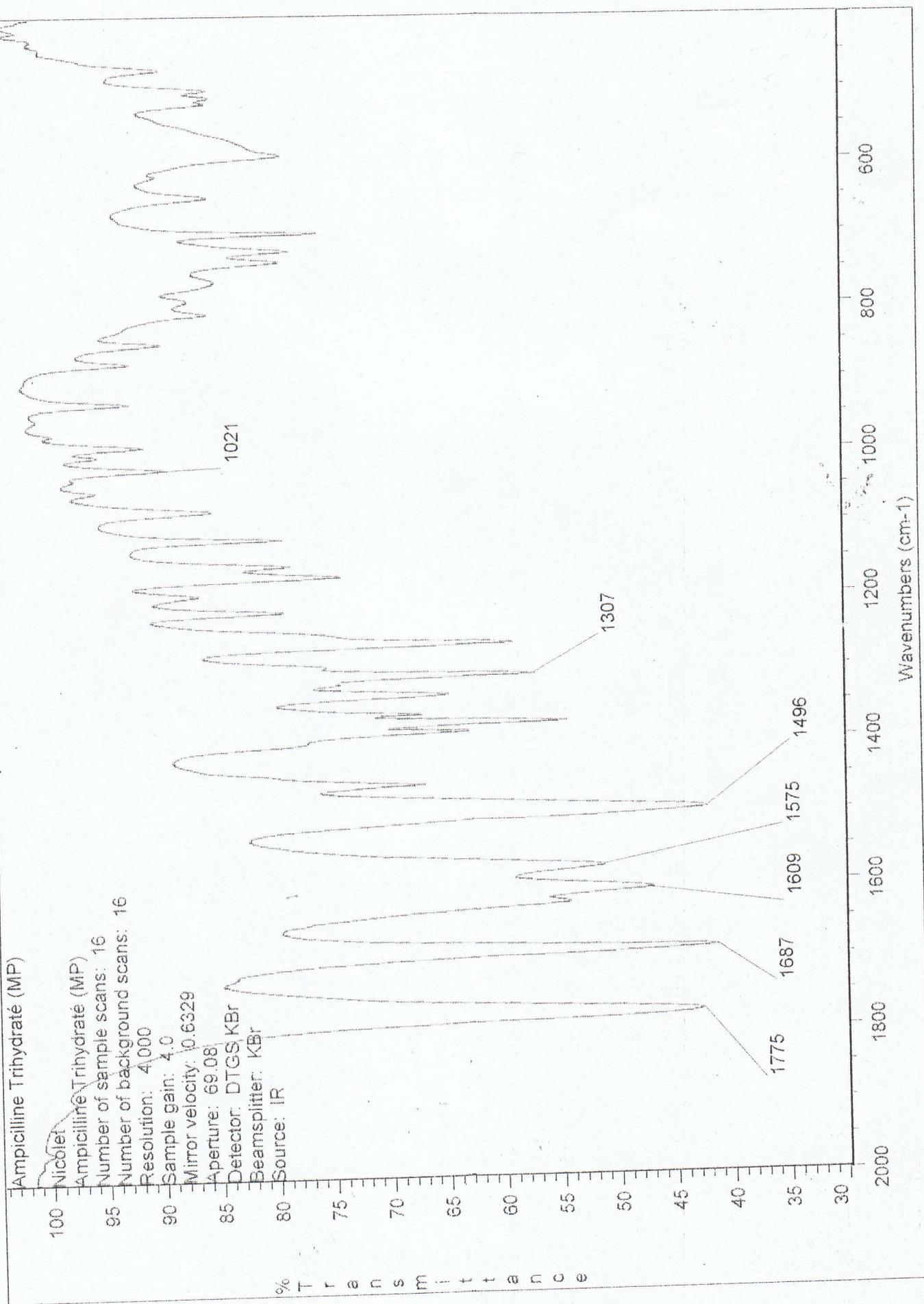
Ampicillin Trihydrate

Phase: Potassium bromide disc



Ampicilline Trihydraté (MP)

Nicolet
Ampicilline Trihydraté (MP)
Number of sample scans: 16
Number of background scans: 16
Resolution: 4.000
Sample gain: 4.0
Mirror velocity: 10.6329
Aperture: 69.08
Detector: DTGS, KBr
Beamsplitter: KBr
Source: IR



BIBLIOGRAPHY

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P.lechat .- **Abrégé De Pharmacologie Médicale** .Ed.Masson, 5eme édition, paris,1990,pp(19-20).
- (2) J.M.AIACH – **Biopharmacie : Galenica 2**, 2^{ème} édition . Ed. TEC & DOC, Lavoisier, 1982.
- (3) Y.ADAM – **Médicaments Antibiotiques**, volume 2 .Ed .TEC & DOC, Lavoisier, 1992, pp (70 79).
- (4) J.P.Larpent, J.J.Sanglier.- **Biotechnologie Des Antibiotiques**. Ed .Masson, paris,1989 ,pp(1-3,109).
- (5) J.P.Giroud, G.Mathé, G.Meyniel. – **Pharmacologie clinique bases de la thérapeutique**, Tome 2 . Ed. Expansion Scientifique Française, 1979, pp (1225, 1281, 1289).
- (6) **British Pharmacopeia** , volume II , 1993,p714.
- (7) **Vidal, le dictionnaire**.Ed.Vidal, 1991.
- (8) JP LABAUNE , al . – **Propriétés Pharmacocinétique Des Médicaments** .Ed. Masson , paris, 1991, p108.
- (9) **Larousse Médicale**, édition entièrement refondue et augmentée d'un supplément, 1978,pp(1157-1159).
- (10) Albert.lespagnol.-**Chimie Des Médicaments** , tome 1 , Entreprise Moderne D'édition ,1974.

- (11) G.MAHUZIER , M.HAMON. –**Abrégé De Chimie Analytique : Méthodes De Séparation**, tome2. Ed.Masson, 2eme édition, paris, 1990, pp(131,153,160).
- (12) R.ROSSET, M.CAUD, A.JARDY. –**Manuel Pratique De Chromatographie En Phase Liquide** .Ed.Masson, 2eme édition , paris, 1990, p3.
- (13) ER.Adlard, P.A.Swell– **Chromatography Abstracts**, volume 32 . N°10 . Ed .Elsevier Applied Science, 1989, p385.
- (14) ER.Adlard, P.A.Swell – **Chromatography Abstracts**, volume 36 . N°2 . Ed .Elsevier Applied Science, 1989, p134.
- (15) **Journal of Chromatography . Biomedical Applications**, volume 145, N°3, Elsevier Scientific Relishing Company,1978, pp(496-501).
- (16) J.W.MUNSON. – **Pharmaceutical Analysis : Modern Methods , Part B**, volumel1.ed.M.Dekker, 1984, p90.
- (17) Gerald. L. Hawk. – **Biological /Biomedical Applications of Liquid Chromatography**, Volume 12. Ed. Dekker, 1979, p11.
- (18) **Guide Pratique Du Laboratoire De Chimie : 4- Méthode D'analyse** .Ed.Delta et Spes, 1984, pp(159,188,199).
- (19) Dominique . PRADEAU. – **L'analyse Pratique Du Médicament** . Ed.Tec et DOC, Lavoisier, 1992, pp(115-137).
- (20) **STP PHARMA PRATIQUE : Méthode Chromatographique Dans les Milieux Biologiques**, 1997, pp (169 – 194).
- (21) **Pharmacopée Européenne**, 1997, pp(412-413).
- (22) A.C Moffat. – **Clark's Isolation And Identification of Drugs**. The Pharmaceutical Press. 2eme édition, 1986, p381.